

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

Mecanismos implicados en los efectos cardiacos de leptina

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Nieves Gómez Hurtado

Directoras

Carmen Delgado Canencia
María Soledad Fernández Alfonso

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**MECANISMOS IMPLICADOS EN LOS EFECTOS
CARDIACOS DE LEPTINA**

TESIS DOCTORAL
NIEVES GÓMEZ HURTADO
Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**MECANISMOS IMPLICADOS EN LOS EFECTOS
CARDIACOS DE LEPTINA**

TESIS DOCTORAL

Directoras:
Dra. Carmen Delgado Canencia

Dra. M^a Soledad Fernández Alfonso

Nieves Gómez Hurtado

Departamento de Farmcología. Facultad de Medicina.
Universidad Complutense de Madrid.
Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera mostrar mi agradecimiento a tantas personas que han hecho posible esta Tesis Doctoral:

A mis Directoras de Tesis, la Dra. Carmen Delgado y la Dra M^a Soledad Fernández por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y realizar esta tesis doctoral y por ser un ejemplo a nivel profesional pero también a nivel personal. Sin sus muchos y muy buenos consejos, sus críticas constructivas y su apoyo no podría haber llegado hasta aquí.

A los Directores del Departamento, el Dr. Ignacio Lizasoain y la Dra. M^a Isabel Colado por permitirme incorporarme y trabajar en el departamento.

A la secretaria del departamento, M^a Elena por su eficiencia y su bien hacer.

A Fernando, M^a Luisa y especialmente a Manolo, por su asistencia técnica, su paciencia y por todo lo que me ha enseñado durante estos años.

A los diferentes jefes de grupo del departamento, por su ayuda y sus consejos desinteresados y por hacerme sentir parte de sus grupos de investigación.

A la Dra. Ana María Gómez y al Dr. Jean Pierre Bénitah, así como a su grupo del INSERM en París por su acogida y su inestimable ayuda.

A María y a Gema por ser las mejores compañeras de laboratorio y maestras que se puede tener aun no estando ya en el laboratorio.

A Rafa, por su aguante con la tesis y la pretesis, por estar siempre dispuesto a ayudar y por aportar al pollo Mario al laboratorio. Gracias a los dos por hacerme reir incluso cuando no me apetecía.

A mis compañeros de departamento y mis amigos, por aguantarme y ayudarme durante estos años, en los momentos buenos y en los no tan buenos, porque siempre y hasta desde la distancia se notaba su apoyo cuando las cosas se ponían cuesta arriba. Gracias por tantos y tantos “ánimo Ni, que sabemos que puedes”.

Y por supuesto quiero agradecerles y dedicar esta tesis a mi familia, sobre todo a mis padres mis dos grandes pilares y los principales responsables de que haya llegado hasta aquí, porque sin sus enseñanzas y su apoyo incondicional nada de esto habría sido posible.

Y finalmente a Andrés. Esta tesis es tan tuya como mía, sin tu ayuda y tu fe en mi aun seguiría buscando el camino. Gracias por ser el mejor compañero de viaje.

SUMMARY

INTRODUCTION:

Leptin, the product of the obese (ob) gene, is a 16-kDa adipocytokine hormone that is involved in the regulation of energetic balance and appetite. Initially, the expression and secretion of leptin was thought to be limited to adipose tissue but it is increasingly recognized that leptin also exerts a broad range of actions on peripheral organs, including the heart. Leptin receptor isoform a (Ob-Ra) and b (Ob-Rb) have been shown to be expressed in myocardium suggesting that leptin has specific cardiac effects.

Obesity is related to high levels of leptin and clinical studies have found positive associations among hyperleptinemia, obesity and cardiac hypertrophy. These findings are consistent with experimental studies that have reported pro-hypertrophic effects of leptin in rat neonatal and human pediatric cardiomyocytes.

Cardiac hypertrophy is regarded as an adaptive response of the heart to biomechanical, hemodynamic or neurohumoral stimuli, aiming to normalize wall stress and to maintain ventricular function. However, in the long term, cardiac hypertrophy predisposes individuals to heart failure (HF), myocardial infarction and sudden death. Several changes that occur in the hypertrophied heart, including fibrosis, dispersion of refractoriness and alteration in the expression and/or function of several cardiac ionic channels make the heart more prone to arrhythmias. It is well established that a reduction in the densities of repolarizing K^+ currents and a prolongation of action potential duration (APD) are common features of the hypertrophied heart which have been linked to trigger arrhythmias. Indeed, the physiological cardiac hypertrophy that occurs with exercise training, shows normal cardiac structure and is not associated with electrical abnormalities. It is generally accepted that the activation of the phosphoinositide3-kinase (PI3K) /Akt pathway is involved in the development of physiological hypertrophy and it has been recently demonstrated, that enhanced cardiac PI3K signalling due to exercise, up-regulates repolarizing K^+ channels and can contribute to reduce the arrhythmogenic electrical remodelling by normalizing K^+ current densities and APD in a model of pathological hypertrophy.

Leptin cardiac receptor stimulation is classically associated with janus kinase (JAK)/ signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling, but also with the activation of the PI3K-Akt and MAPK pathways which have been implicated in cardioprotection and myocyte hypertrophy

During the last years, increasing attention has been paid to understand the mechanisms involved in the effects of leptin on cardiac function and remodeling. However, up to date no information is available analyzing the pro-hypertrophic effect of leptin on adult ventricular myocytes, the modulation of cardiac ionic channels by prolonged leptin treatment, or the effect of non-hypertensives doses of leptin on cardiac function

Therefore, with this background the main objectives of this Doctoral Thesis were:

OBJECTIVES:

1. To analyze the prohypertrophic effect of leptin in adult ventricular cardiomyocytes and the intracellular pathways involved in this effect.
2. To analyze leptin effect in ion channel remodeling and the intracellular pathways involved in this effect.
3. To determine leptin effects in cardiac function by studying the excitation-contraction coupling in adult ventricular myocytes.
4. To analyze the pathways involved in leptin effects on cardiac contractility.

METHODS:

Isolation of adult ventricular cardiomyocytes and experimental design.: For the in vitro study adult male Wistar rats (250-300g) were heparinized (4 IU/g ip) and appropriated anesthetized (sodium pentobarbital, 50mg/kg, i.p.) with analgesia (buprenorfin, 0.05mg/kg, i.p.). Adequacy of the anesthesia was determined by assessing loss of the pedal reflex. Ventricular myocytes were isolated by Langendorff perfusion using collagenase (251 IU/mL, Worthington type II).

For each experiment, we employed adult ventricular cardiomyocytes (AVC) isolated from two rat hearts. AVC were pooled and equally divided into four portions that were incubated for 48h with vehicle, with 100ng/mL leptin, with Akt, ERK 1/2 or mTOR inhibitors or with the inhibitors plus leptin.

For the in vivo model, ALZET™ osmotic pumps were implanted in 8 weeks C57Bl/6J mice. Pumps were filled with saline solution or with leptin 0.36 mg/kg/day. Mice were sacrificed after 3 weeks treatment.

Measurement of cell surface area: The area of AVC (length x width) was measured (in μm^2) using an inverted microscope (Olympus IMT-2) fitted with a gridded ocular lens, at x40 magnification. The cell size was obtained by measuring the surface area of 20 randomly selected cells for each group.

Electrophysiological studies: Electrophysiological experiments were performed at room temperature (24-26°C) on AVC, using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique.

Confocal Ca^{2+} images: Intact myocytes were loaded with the fluorescence Ca^{2+} dye Fluo-3 AM (6 $\mu\text{mol/L}$) for 30 min. Images were obtained with confocal microscopy (Leica SP5, objective w.i. 63x). To record $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients, cells were excited at 2 Hz by field stimulation. SR Ca^{2+} load was estimated by caffeine application (10 mmol/L).

RNA Extraction and Real-Time RT PCR: RNA was extracted from AVC using TRIzol reagent (Invitrogen), followed by chloroform extraction and isopropanol precipitation. Samples were stored at -80°C until RT-PCR was performed using the IQ-5 Bio-Rad Detection System, following the TaqMan RT Assay protocol.

Western Blot: AVC were homogenized and centrifuged at 13,000 g for 15 min at 4°C. The supernatants were used for immunoblotting. Proteins were separated by SDS-PAGE transferred onto PVDF membranes, blocked, and incubated overnight with primary antibodies.

Immunoprecipitation: Homogenates were incubated with monoclonal anti-eNOS and immunoprecipitated with protein A/G Sepharose. The immunoprecipitated protein was loaded and immunoblotted with acetylated lisines antibody to detect eNOS acetylations.

ELISA: ELISA measurements were carried out following manufacturer specifications.

Statistical analysis: Data are presented as means \pm SE. Statistical significance was evaluated by Student's t-test or one-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparison tests. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS:

We first studied leptin treatment effect in cell size in our adult ventricular cardiomyocytes (AVC). 48h treatment with leptin 100 ng/ml induced an increase in cell size in a concentration-dependent manner. Moreover, leptin treatment for 48h induced an increase in the hypertrophic gene programme.

To get an insight into the mechanism responsible for this effect, we analyzed the intracellular pathways activated by leptin treatment. Leptin activated ERK 1/2, p38, STAT-3 and Akt pathways in AVC.

As Akt and ERK1/2 have been related to cardiac hypertrophy, we inhibited these signaling pathways in our cells and then we incubated them with leptin. In the presence of Akt and ERK1/2 inhibitors leptin was unable to induce an increase in cell size. Moreover, when we inhibited the downstream target of Akt, mTOR, leptin did not have any prohypertrophic effects in cardiomyocytes.

In the next group of experiments we analyzed leptin effect in ionic remodeling in AVC. Leptin treatment for 48 hours induced an increase in Kv4.2, Kv4.3 and KChIP2 mRNA and protein expression that was prevented with Akt inhibitor. Furthermore, leptin treatment induced an increase in I_{toF} amplitude and density without modifying I_{toF} activation or inactivation properties. This effect on I_{toF} density was prevented when we pre-treated cells with Akt inhibitor triciribine.

Finally, we analyzed leptin effect in cardiac function in vivo. For this group of experiments we treated C57Bl/6J mice with leptin 0.36 mg/kg/day for three weeks. After the treatment we did not observe any differences neither in mice weight nor in heart weight compared to animals

treated with saline solution. Moreover, leptin receptor expression in the heart was not modified by the treatment. However, cardiac function was impaired. To make an in depth analysis of the mechanism involved in this effect we used confocal microscopy to study excitation-contraction coupling.

Leptin treatment for 3 weeks induced a reduction in calcium transient amplitude without modifying SR Ca^{2+} load. Cell shortening was also reduced. Furthermore, leptin induced a decrease in sparks amplitude. These changes in calcium handling were related to an increase in $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger protein expression and in RyR phosphorylation in Ser2808. However, SERCA was not modified by the treatment.

To analyze the possible mechanism involved in the negative inotropic effect induced by leptin we measured eNOS pathway activation. Leptin induced an increase in eNOS phosphorylation and a decrease in eNOS acetylation that was accompanied by an increase in SIRT-1 expression.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS:

The novel finding of this study is that leptin can induce hypertrophy in adult ventricular myocytes and also up-regulate K^+ channels through Akt-pathway activation. In addition, our results also demonstrate that leptin induces heart failure in vivo.

Our study is consistent with other reports which have proved that leptin induces cardiac hypertrophy in vitro. We have shown that 48h incubation with 100ng/mL leptin enhanced significantly the surface area and membrane capacitance of AVC. Moreover, cardiac hypertrophy has been associated with re-expression/upregulation of the fetal cardiomyocyte gene programme and down-regulation of K^+ currents. Our results show an increase in β -myosin heavy chain and in skeletal α actin without modifying ANP expression and are consistent with those reported in a model of physiological cardiac hypertrophy in transgenic mice expressing a cardiac-specific constitutively active form of PI3K.

On the other hand, we have analyzed for the first time the influence of leptin on cardiac channels remodeling. It is well known that the alteration of K^+ channels is a major cause of electrophysiological remodeling in pathological hypertrophy and it has been widely demonstrated that the 4-AP-sensitive transient outward potassium current (I_{tof}) which plays an important role during the early phase of the rat cardiac AP, is down-regulated in many models of pathological hypertrophy contributing to the action potential prolongation associated with left ventricular hypertrophy (LVH) and HF. Interestingly, the results of the present study show that the gene and the protein expression of Kv4.2, Kv4.3 and KChIP2 the subunits encoding the 4-AP-sensitive I_{to} in the rat are up-regulated in the hypertrophied myocytes treated with leptin. This up-regulation results in increased I_{tof} amplitudes and densities. A similar up-regulation of K^+ channels have been reported in a model of physiological hypertrophy induced by exercise training or by cardiac-specific expression of constitutively active form of PI3K.

We have also found in the present study that leptin induced activation of Akt and ERK 1/2 signaling pathways in AVC and pharmacological inhibition of these pathways prevents the leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy. Activated Akt can phosphorylate several downstream targets including the mammalian target of rapamycin (mTOR) which by changes in gene transcription and translation promotes increased growth. Both mTOR and one of its key downstream targets, p70S6K kinase (S6K1) have been extensively studied for their effects during cardiac hypertrophy. In addition, our study has shown that p70S6K was activated by leptin in cardiomyocytes. Moreover, the mTOR inhibitor rapamycin prevented the leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy suggesting that PI3K(p110 α)-Akt and mTOR/p70S6K pathways play an important role in the mechanism of leptin-induced hypertrophy in AVC.

It has been recently demonstrated that enhanced cardiac PI3K α signaling is involved in increasing K^+ currents, normalizing ventricular repolarization and reducing arrhythmogenic electric remodeling in pathological hypertrophy. Severe obesity is related to high levels of leptin and is often associated with diabetes and/or hypertension providing a status of complicated obesity. In this scenario, the mechanism of leptin-induced up-regulation of K^+

channels that we have shown in our experimental study might have a beneficial effect by protecting the pathologic heart from an excessive prolongation of action potential duration, reducing the increased risk of arrhythmias and sudden death in patients with complicated obesity.

However, letpin cardiac specific effects in vivo should be taken into account. It is well known that leptin in vivo has both direct and indirect effect derived from leptin ability to increase blood pressure. Thus, to avoid the indirect effects of leptin we used for this study a non hypertensive dose of leptin. We have found that leptin in this dose is able to induce heart failure after 3 weeks of treatment and that it is mediated by changes in calcium handling related proteins.

It has been demonstrated that cardiac hypertrophy and heart failure are frequently associated to an increase in $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger expression which in hypertrophic hearts is accompanied by an increase in SERCA activity that does not occur during heart failure. Our results show an increase in NCX expression without changes in SERCA activity. These results are consistent with the impaired cardiac function observed by echocardiography and the reduction in calcium transient amplitude and in the decay constant of calcium extrusion from the cytosol measured by confocal microscopy and also with the non altered SR Ca^{2+} load observed in our cells.

In addition to that, changes in RyR phosphorylation have been related to heart failure. It has been described that during heart failure a hyperphosphorylation of RyR in PKA site of phosphorylation (Ser2808) occurs. An increase in RyR Ser2808 phosphorylation promotes subconductancy states in RyR that can lead to smaller sparks and transients. We have found that leptin is able to induce an increase in RyR phosphorylation in Ser2808 that is consistent with the reduction in sparks amplitude observed by confocal microscopy.

Previous reports have associated the negative inotropic effect induce by leptin with eNOS activity. It is known that eNOS is activated by phosphorylation in Ser1177 and then by deacetylation in the calmodulin-binding domain. In this regard, SIRT-1 is a deacetylase

involved in eNOS deacetylation and it has been demonstrated that leptin is able to increase SIRT-1 expression in the brain cortex. Our results show that leptin treatment is also able to activate eNOS phosphorylation in cardiomyocytes and also induce an increase in SIRT-1 expression. Moreover, eNOS acetylation levels are reduced in cardiomyocytes from animals treated with leptin. So, we propose that leptin-induced negative inotropic effect may be mediated by an increase in NO levels due to an increase in eNOS activation by SIRT-1.

Thus, the results presented in this Doctoral Thesis are, to our knowledge, the first to demonstrate that leptin induces a pro-hypertrophic effect in adult ventricular cardiomyocytes that is mediated by ERK 1/2 and PI3K/Akt/mTOR pathways. We also demonstrate, for the first time, that leptin is able to induce an ionic remodeling that affects I_{toF} due to an increase in Kv4.2, Kv4.3 and KChIP2 mRNA and protein expression mediated by Akt pathway. And finally, we have demonstrated, for the first time, that leptin in a non-hypertensive dose induces heart failure in vivo that is accompanied by an increase in NCX expression and in RyR phosphorylation in Ser2808. Leptin also induces an increase in eNOS activity that may participate in the negative inotropic effect induced by leptin.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

Leptina, producto del gen de la obesidad (OB), es una adipocitoquina de 16 kDa implicada en la regulación del balance energético y del apetito. Inicialmente se pensó que la expresión y secreción de leptina se limitaba al tejido adiposo, pero actualmente se ha demostrado que leptina también ejerce un gran número de acciones en órganos periféricos, entre los que se incluye el corazón. Las isoformas Ob-Ra y Ob-Rb del receptor de leptina se expresan en el miocardio, lo cual sugiere que leptina tiene efectos cardiospecíficos.

La obesidad se relaciona con niveles de leptina elevados y en varios estudios clínicos se ha encontrado una asociación positiva entre la hiperleptinemia, la obesidad y la hipertrofia cardíaca. Estos hallazgos son consistentes con los estudios experimentales que han demostrado un efecto pro-hipertrófico de leptina en cardiomiocitos neonatales de rata y cardiomiocitos pediátricos humanos.

La hipertrofia cardíaca se considera una respuesta adaptativa del corazón a estímulos biomecánicos, hemodinámicos o neurohumorales que tiene la finalidad de normalizar el estrés de la pared ventricular y mantener su función. Sin embargo, a largo plazo, la hipertrofia cardíaca predispone a los individuos a padecer insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio y muerte súbita. Algunos cambios que ocurren en el corazón hipertrófico, incluyendo la fibrosis, la dispersión o refractariedad y la alteración en la expresión y/o función de varios canales iónicos hacen al corazón más propenso a la aparición de arritmias. Además, una reducción en la densidad de las corrientes repolarizantes de potasio y una prolongación de la duración del potencial de acción (DPA) son algunas de las características que se observan con frecuencia en el corazón hipertrófico y que se han relacionado con la aparición de arritmias. De hecho, en la hipertrofia cardíaca fisiológica debida al ejercicio físico, se observa una estructura cardíaca normal y no se asocia con anomalías eléctricas. Generalmente se acepta que la activación de PI3K/Akt está relacionada con el desarrollo de hipertrofia fisiológica, y recientemente se ha demostrado que un incremento de la actividad de PI3K, debido al ejercicio, implica una regulación al alza de los canales de potasio que codifican para las corrientes implicadas en la repolarización y puede contribuir a reducir el remodelado eléctrico arritmogénico al normalizar las corrientes de potasio y la DPA en un modelo de hipertrofia patológica.

La estimulación del receptor de leptina se asocia con la vía de JAK y la activación de factores de transcripción STAT, pero también con la activación de PI3K-Akt y MAPK, vías que se han implicado en cardioprotección e hipertrofia de los cardiomiocitos.

En los últimos años, se ha dedicado un gran esfuerzo a intentar entender los mecanismos implicados en los efectos de leptina en la función y remodelado cardíacos. Sin embargo, hasta la fecha, no hay estudios que analicen los efectos pro-hipertróficos de leptina en miocitos ventriculares adultos, la modulación de los canales iónicos por un tratamiento prolongado con leptina, o el efecto de dosis no hipertensivas de leptina sobre la función cardíaca.

Por lo tanto, con estos antecedentes, los principales objetivos de la presente tesis doctoral fueron:

OBJETIVOS:

1. Analizar los efectos pro-hipertróficos de leptina en miocitos ventriculares adultos y las vías de señalización intracelular implicadas en estos efectos.
2. Analizar los efectos de leptina en el remodelado iónico y las vías de señalización implicadas en este efecto.
3. Determinar los efectos de leptina en la función cardíaca mediante el estudio del proceso de acoplamiento excitación-contracción en miocitos ventriculares adultos.
4. Analizar las vías de señalización implicadas en los efectos de leptina sobre la contractilidad cardíaca.

MÉTODOS:

Aislamiento de cardiomiocitos ventriculares y diseño experimental.: Para el estudio in vitro se heparinizaron (4 UI/g ip) ratas Wistar macho (250-300g) y posteriormente se anestesiaron (pentobarbital sódico, 50 mg/kg ip) con analgesia (buprenorfina, 0.05 mg/kg ip). El efecto del anestésico se determinó mediante la comprobación de la pérdida del reflejo podal. Los miocitos ventriculares se aislaron por perfusión retrógrada en un sistema de Langendorff utilizando colagenasa tipo 2 (251 UI/mL, Worthington).

Para cada experimento, se utilizaron los miocitos ventriculares adultos aislados del corazón de dos ratas Wistar. Los miocitos se almacenaron en solución de store y posteriormente se dividieron en 4 grupos que se incubaron 48h con el vehículo, con 100 ng/mL de leptina, con los inhibidores de Akt, ERK1/2 o mTOR o con los inhibidores más leptina.

Para el estudio in vivo, se implantaron bombas osmóticas ALZET® en ratones de 8 semanas de la cepa C57Bl/6J. Las bombas se llenaron con solución salina o con leptina en una dosis de 0.36 mg/kg/día. Los ratones se sacrificaron tras 3 semanas de tratamiento.

Medición de la superficie celular: El área de los miocitos ventriculares (largo x ancho) se midió (en μm^2) utilizando un microscopio invertido (Olympus IMT-2) al que se le acopló una lente graduada. El tamaño celular se obtuvo midiendo el área de 20 células seleccionadas al azar por cada grupo y experimento.

Estudios electrofisiológicos: Los experimentos de electrofisiología se llevaron a cabo a temperatura ambiente (24-26°C) en los miocitos ventriculares adultos usando la configuración de célula entera de la técnica de parche de membrana (patch clamp).

Imágenes de Ca^{2+} por microscopía confocal: Los miocitos ventriculares se cargaron con un fluoróforo dependiente de Ca^{2+} , el Fluo-3 AM (6 $\mu\text{mol/L}$) durante 30 minutos. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal (Leica SP5, objetivo 63x). Para grabar los transitorios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, las células se excitaron a 2 Hz por estimulación de campo. La carga de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico se estimó por aplicación de cafeína (10 mmol/L).

Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa: El ARN se extrajo de los miocitos ventriculares usando TRIzol (Invitrogen), seguido por extracción con cloroformo y precipitación con isopropanol. Las muestras se guardaron at -80°C hasta que se realizó la RT usando el sistema de detección de Bio-Rad IQ-5, seguido de un protocolo de qPCR para sondas TaqMan.

Western Blot: Los miocitos ventriculares se homogenizaron y centrifugaron a 13,000 g durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se usaron para el inmunoblot. Las proteínas se

separaron usando la técnica de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Posteriormente se bloquearon, e incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios.

Inmunoprecipitación: Los homogenados se incubaron con un anticuerpo anti-eNOS monoclonal y se inmunoprecipitaron con proteína A/G Sefarosa. Las proteínas inmunoprecipitadas se cargaron y separaron para Western blot. Las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-acetil-lisinas para detectar las acetilaciones de la eNOS.

ELISA: El ELISA se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico: Los datos se muestran como media \pm SE. La significación estadística se evaluó mediante una *t* de Student o ANOVA de una vía seguida del test de comparación múltiple Bonferroni. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS:

En primer lugar estudiamos el efecto del tratamiento con leptina sobre el tamaño de los miocitos adultos. 48 horas de tratamiento con leptina indujeron un incremento en el tamaño celular de una forma dependiente de la concentración. Además, el tratamiento con leptina durante 48 horas indujo una activación del programa de genes hipertróficos.

Para intentar elucidar los mecanismos responsables de este efecto, analizamos las vías de señalización activadas por el tratamiento con leptina. Leptina activó las vías de ERK1/2, p38, STAT-3 y Akt en los miocitos ventriculares.

Puesto que Akt y ERK1/2 se han relacionado con la hipertrofia cardiaca, inhibimos estas vías de señalización en nuestras células y posteriormente las tratamos con leptina. En presencia de los inhibidores de Akt y ERK1/2 leptina no indujo incremento del tamaño celular. Además, cuando inhibimos mTOR, una de las dianas de Akt, leptina tampoco indujo un incremento del tamaño celular.

En el siguiente grupo de experimentos analizamos los efectos de leptina sobre el remodelado eléctrico en los miocitos ventriculares adultos. El tratamiento con leptina durante 48 horas indujo un incremento de la expresión génica y proteica de Kv4.2, Kv4.3 y KChIP2 que se previno con el inhibidor de Akt. Además, el tratamiento con leptina indujo un incremento en la amplitud y densidad de la I_{tof} sin modificar las propiedades de activación e inactivación de la corriente. Este efecto en la densidad de la I_{tof} se previno cuando pre-tratamos las células con el inhibidor de Akt, triciribina.

Finalmente, analizamos el efecto de leptina sobre la función cardíaca in vivo. Para este grupo de experimentos se trataron ratones de la cepa C57Bl/6J con leptina a una dosis de 0.36 mg/kg/día durante 3 semanas. Tras el tratamiento no se observaron diferencias ni en el peso de los animales, ni en el peso del corazón en los animales tratados con leptina frente a los animales tratados con solución salina. Sin embargo, la función cardíaca se vio afectada por el tratamiento. Para analizar en profundidad los mecanismos implicados en este efecto usamos la microscopía confocal para estudiar el acoplamiento excitación-contracción.

El tratamiento con leptina durante 3 semanas indujo una reducción en la amplitud de los transitorios de calcio sin modificar la carga del retículo. El acortamiento celular también se redujo en los animales tratados. Además, leptina indujo una reducción en la amplitud de los sparks. Estos cambios en la homeostasis del calcio se relacionaron con un incremento en la expresión proteica del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y en la fosforilación del receptor de rianodina en la serina 2808. Sin embargo, la actividad de la SERCA no se modificó por el tratamiento

Para analizar el posible mecanismo implicado en el efecto inotrópico negativo de leptina medimos la activación de la vía de eNOS. Leptina indujo un incremento de la fosforilación y una disminución de la acetilación de eNOS que se acompañó de un incremento en la expresión de SIRT-1.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

La novedad de este estudio es que leptina puede inducir hipertrofia en cardiomiocitos ventriculares adultos y, además, regular al alza la expresión de canales de potasio mediante un mecanismo dependiente de Akt. Además, nuestros resultados demuestran que leptina induce una insuficiencia cardíaca *in vivo*.

Nuestro estudio es consistente con otros que previamente han probado que leptina induce hipertrofia cardíaca *in vitro*. Hemos demostrado que la incubación de las células con leptina durante 48 horas incrementa de forma significativa la superficie y la capacitancia de membrana de los miocitos ventriculares adultos. Además, la hipertrofia cardíaca se ha asociado con la re-expresión/regulación al alza del programa de genes fetales y con una disminución de corrientes de potasio. Nuestros resultados muestran un incremento de la cadena pesada de la β -miosina y de la α -actina esquelética, mientras que la expresión de ANP no se modifica. Estos datos son consistentes con los obtenidos por otros autores en un modelo de hipertrofia cardíaca fisiológica en ratones transgénicos que sobreexpresan PI3K en el corazón.

Por otro lado, hemos analizado por primera vez la influencia de leptina en el remodelado iónico. Las alteraciones en los canales de potasio son una de las principales causas del remodelado electrofisiológico en la hipertrofia patológica y se ha demostrado que la I_{toF} , que juega un papel fundamental en la fase temprana de repolarización del potencial de acción cardíaco en la rata, se encuentra disminuida en la hipertrofia patológica. Esta disminución de la I_{toF} contribuiría a la prolongación de la DPA asociada con la hipertrofia del ventrículo izquierdo y la insuficiencia cardíaca. Los resultados de la presente tesis doctoral muestran que la expresión génica y proteica de las subunidades Kv4.2, Kv4.3 y KChIP2, que codifican la I_{toF} , se encuentran aumentadas tras el tratamiento con leptina. Este aumento resulta en un incremento de la amplitud y densidad de la I_{toF} . En un modelo de sobre-expresión selectiva de PI3K en el corazón también se ha observado un incremento similar de canales de potasio.

Además, hemos demostrado que leptina induce una activación de Akt y ERK1/2 en los miocitos adultos y que la inhibición farmacológica de estas vías previene la hipertrofia inducida por leptina. La Akt activada puede fosforilar varias dianas entre las que se encuentra mTOR, el cual mediante cambios transcripcionales promueve el crecimiento celular. Tanto mTOR como su diana P70S6K se han estudiado en relación con la hipertrofia cardiaca. Además, el inhibidor de mTOR previno la hipertrofia inducida por leptina, sugiriendo que PI3K/Akt y mTOR/P70S6K juegan un papel fundamental en la hipertrofia cardiaca inducida por leptina en miocitos adultos.

Recientemente se ha demostrado que una actividad aumentada de PI3K se relaciona con un aumento de corrientes de potasio, normalización de la repolarización ventricular y reducción del remodelado arritmogénico en la hipertrofia patológica. La obesidad mórbida se relaciona con niveles elevados de leptina y se asocia frecuentemente con diabetes y/o hipertensión. En este escenario, el mecanismo por el que leptina induce una regulación al alza de canales de potasio como el observado en el presente estudio puede tener efectos beneficiosos al proteger el corazón patológico del riesgo incrementado de padecer arritmias y muerte súbita en pacientes con obesidad complicada con otras patologías.

Sin embargo, hay que tener en cuenta también los efectos cardiospecíficos de leptina *in vivo*. Se sabe que leptina *in vivo* tiene efectos directos en el corazón pero también efectos derivados de su capacidad de activar el sistema simpático. Para evitar los efectos derivados de una posible activación simpática hemos empleado una dosis no hipertensiva de leptina. Nuestro estudio demuestra que, tras 3 semanas de tratamiento, leptina induce insuficiencia cardiaca debido, al menos en parte, a cambios en las proteínas relacionadas con la homeostasis del calcio.

La hipertrofia cardiaca y la insuficiencia cardiaca se asocian con frecuencia con un incremento de la expresión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que en la hipertrofia se acompaña con un incremento de la actividad de la SERCA pero que no ocurre en la insuficiencia. Nuestros resultados muestran un incremento en la expresión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sin cambios

en la actividad de la SERCA. Estos resultados son consistentes con la insuficiencia observada por ecocardiografía y la reducción de los transitorios de calcio, de la constante de caída de la extrusión de calcio y el mantenimiento de la carga del retículo medidos por microscopía confocal tras el tratamiento con leptina.

Además, se han asociado con la insuficiencia cardíaca cambios en la fosforilación de la rianodina. Se ha descrito que en la insuficiencia se produce una hiperfosforilación de la rianodina en el sitio de la PKA (Ser2808). Un incremento en la fosforilación de la Ser2808 da lugar a estados de subconductancias en la rianodina que conducen a sparks y transitorios de calcio más pequeños. Nuestros datos muestran que leptina induce un incremento de la fosforilación de la rianodina en la Ser2808 que es consistente con la reducción de los sparks observada mediante microscopía confocal.

Estudios previos han asociado el efecto inotrópico negativo inducido por leptina con actividad de la eNOS. Se sabe que la eNOS se activa por fosforilación de la Ser1177 y por desacetilación del dominio de unión a calmodulina. En este sentido, SIRT-1 es una desacetilasa implicada en la desacetilación de eNOS y se ha demostrado que leptina puede incrementar su expresión en la corteza cerebral. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con leptina también induce un incremento de la fosforilación de eNOS y de la expresión de SIRT-1 en cardiomiocitos. Además, los niveles de acetilación de eNOS están reducidos en los miocitos procedentes de animales tratados con leptina. Por ello, proponemos que la leptina induce un efecto inotrópico negativo que puede estar mediado por un incremento de los niveles de NO debido al incremento de la actividad de eNOS inducido por SIRT-1.

Así pues, los resultados presentados en la presente tesis doctoral demuestran por primera vez que leptina induce:

- Un efecto pro-hipertrófico en miocitos ventriculares adultos que está mediado por ERK1/2 y PI3K/Akt/mTOR.

- Un remodelado iónico que afecta a la I_{tof} debido a un incremento de la expresión génica y proteica de Kv4.2, Kv4.3 y KChIP2 mediado por Akt.
- Insuficiencia cardíaca *in vivo* que se acompaña de un incremento en la expresión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y de la fosforilación de la rianodina en la Ser2808.
- Un incremento de la actividad de eNOS mediado por desacetilasas que puede participar en el efecto inotrópico negativo inducido por leptina.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

[Ca²⁺]_i: Concentración de calcio intracelular

4-AP: 4-Aminopiridina

AC: Adenilato Ciclasa

Ach: Acetilcolina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico cíclico

ADP: Difosfato de adenosina

AgRP: Proteína relacionada con Agouti

Akt/PKB: Proteína quinasa B

AM: Acetometiléster

AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico

AMPK: Quinasa activada por monofosfato de adenosina

ANF: Factor Natriurético Atrial

ANOVA: Análisis de la varianza

ANP: Péptido Natriurético Atrial

APS: Persulfato de amonio

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Trifosfato de adenosina

ATPasa: Enzima catalizadora de la rotura de ATP

BNP: Péptido Natriurético Cerebral

BSA: Albúmina de suero bovino

CaMKII: Calmodulin quinasa tipo 2

CART: Transcrito regulado por cocaína y anfetamina

CaV_{1.2}: Canal de calcio regulado por voltaje 1.2 (codifica corriente de calcio tipo L)

CaV_{3.1}: Canal de calcio regulado por voltaje 3.1 (codifica corriente de calcio tipo T)

CCD: Dispositivo de carga acoplado a una cámara

Cdc42: Proteína de control de la división 42

CICR: Liberación de calcio inducida por calcio

Cm: Capacitancia de membrana

Cn: Calcineurina

CnA: Calcineurina A

CnA α : Subunidad α de la calcineurina A

CnA β : Subunidad β de la calcineurina A

CnA γ : Subunidad γ de la calcineurina A

Col: Colaboradores

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

Ct: Ciclo umbral de PCR

CT-1: Cardiotrofina 1

db/db: Modelo de ratón deficiente para el receptor de leptina

DEPC: Pirocarbonato de dietilo

DMSO: Dimetil sulfóxido

DPA: Duración del potencial de acción

DTT: Ditiotreitól

ECL: Sustrato para incrementar la quimioluminiscencia

egr-1: Proteína de crecimiento temprano 1

EGTA: Ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)-N, N, N', tetraacético

EIF: Factor de iniciación de eucariotas

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

ERK1/2: Quinasas reguladas por señalización extracelular

fa/fa: Modelo animal de deficiencia en los receptores de leptina

F/Fo: Amplitud del transitorio de calcio

FKBP12: Proteína de unión a FK506

FR: Liberación fraccionada

GADPH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GDP: Difosfato de guanosina

GEF: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina

GMPC: Monofosfato de guanosina cíclico

Gp130: Glicoproteína 130

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G

GSK3 β : Quinasa de la glicógenos sintetasa 3 beta

GTPasa: Enzima catalizadora de la rotura de GTP

HDAC: Histona desacetilasa

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina N-(2-etanosulfónico)

HL-1: Línea celular derivada de tumores de aurícula de ratón

HUVEC: Línea celular derivada de células endoteliales de la vena umbilical humana.

I_{CaL}: Corriente de calcio tipo L

I_{CaT}: Corriente de calcio tipo T

I_f: Corriente activada por hiperpolarización

IGF-1: (Factor de crecimiento insulínico tipo 1

I_K: Corriente de rectificación retardada de potasio

I_{K,rapid}: Componente rápida de la corriente de rectificación retardada de potasio

I_{K,slow}: Componente lento de la corriente de rectificación retardada de potasio

I_{K1}: Corriente de rectificación de entrada de potasio

I_{Kr}: I_{K,rapid}

I_{Ks}: I_{K,slow}

IMC: Índice de Masa Corporal

I_{Na}: Corriente de sodio

I_{NCX}: Corriente del intercambiador Na⁺/Ca²⁺

i.p: Intraperitoneal

I_{to}: Corriente transitoria de potasio

I_{to1}: Corriente transitoria de potasio

I_{to2}: Corriente transitoria de potasio

I_{tof}: Componente rápida de la corriente transitoria de potasio I_{to1}

I_{tos}: Componente lento de la corriente transitoria de potasio I_{to1}

JNK1/2: Quinasa del extremo N-terminal de c-jun

K.O: Knock out

KChIP2: Proteína de interacción con el canal de potasio

kDa: kilo Dalton

Kir_{2.1}: Subunidad del canal de potasio que codifica la corriente I_{K1}

Kv_{1.4}: Subunidad del canal de potasio que codifica la corriente I_{to1}

Kv_{4.2}: Subunidad del canal de potasio que codifica la corriente I_{to}

Kv_{4.3}: Subunidad del canal de potasio que codifica la corriente I_{to}

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LIF: Factor inhibidor de la leucemia

L-NAME: L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (NG-monometil-L-arginina)

Lys-Ach: Lisinas acetiladas

Malonil-CoA: Malonil CoEnzima A

MAPK: Protein quinasas activadas por mitógenos

MC4R: Receptor de Melacortina tipo 4

MEF2: Factor potenciador específico de miocito tipo 2

mg/kg: Miligramos por kilo

mg/kg/día : Miligramos por kilo y día

MKK1: Quinasa de las MAPK tipo 1

MKK3: Quinasa de las MAPK tipo 3

MKK6: Quinasa de las MAPK tipo 6

ml: Mililitro

MLCK: Quinasa de la cadena ligera de la miosina

mM: Milimolar

MMP: Metaloproteinasas

MSH: Hormona estimulante de melanocitos

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero

n: Número de animales o células por grupo

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NCX: Intercambiador sodio calcio

NFAT: Factor nuclear de células T activadas

NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

ng/ml: nanogramos por mililitro

NO: Óxido nítrico

NOS: Sintetasa del Óxido Nítrico

NOS1/nNOS: Sintetasa del Óxido Nítrico neuronal

NOS2/iNOS: Sintetasa del Óxido Nítrico inducible

NOS3/eNOS: Sintetasa del Óxido Nítrico endotelial

NPY: Neuropeptido Y

ob/ob: Modelo animal de deficiencia en leptina

OB-R: Receptor de leptina

P70S6K: Quinasa de la subunidad S6 ribosomal

PA: Potencial de acción

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDE3B: Fosfodiesterasa 3B

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PDK1: Proteína quinasa dependiente de fosfatidilinositol

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasas

PIP₃: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PLB: Fosfolambano

POMC: Proopiomelanocortina

PTP1B: Fosfatasa de tirosina tipo 1B

PVDF: Poliviniliden difluoruro

RNS: Especies reactivas de Nitrógeno

ROCK: Proteína quinasa asociada a la GTPasa Rho

ROS: Especies reactivas de Oxígeno

RS: Retículo Sarcoplásmico

RT: Retrotranscripción

RyR: Receptor de rianodina

sdLDL: Lipoproteínas pequeñas de baja densidad

SDS: Dodecil sulfato sódico

SEM: Error estándar de la media

SERCA: Bomba de calcio dependiente de ATP del retículo sarcoplásmico

SHP-2: Fosfatasa de residuos de tirosina

SIRT-1: Sirtuina 1

SKA: Alfa actina esquelética

SOCS3: Supresor de la señalización de citoquinas de tipo 3

Sparks: Unidades básicas de liberación de Ca²⁺ por el receptor de rianodina

STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción tipo 3

TBS: Tampón salino con Tris

TEA: Tetraetilamonio

TEMED: N,N,N',N'- tetrametilendiamina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TTX: Tetrodotoxina

TYK2: Tirosina quinasa 2

U.I: Unidades internacionales

VI: Ventrículo izquierdo

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

Vs: Versus

α -MHC: Cadena pesada de la α miosina

β -MHC: Cadena pesada de la β miosina

μ l: Microlitros

μ l/hora: Microlitros por hora

μ M: Micromolar

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. LEPTINA.....	5
1.1 ASPECTOS GENERALES.....	5
1.2 RECEPTOR DE LEPTINA.....	6
1.3 REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LEPTINA.....	9
1.4 EFECTOS DE LEPTINA	9
1.4.1 EFECTOS CENTRALES DE LEPTINA	10
1.4.2 EFECTOS PERIFÉRICOS DE LEPTINA.....	10
1.4.3 EFECTOS DE LEPTINA EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR	11
1.4.3.1 EFECTOS VASCULARES DE LEPTINA	11
1.4.3.1.1 EFECTOS HIPERTENSIVOS	11
1.4.3.1.2 EFECTOS ATROSCLERÓTICOS	11
1.4.3.1.3 EFECTOS SOBRE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	12
1.4.3.1.4 EFECTOS SOBRE LA FORMACIÓN DE TROMBOS.....	12
1.4.3.2 EFECTOS CARDIACOS DE LEPTINA	13
1.4.3.2.1 EFECTOS DE LA LEPTINA EN EL METABOLISMO CARDIACO.....	13
1.4.3.2.2 EFECTOS DE LA LEPTINA EN LA APOPTOSIS CELULAR	15
1.4.3.2.3 EFECTOS PRO-HIPERTRÓFICOS DE LA LEPTINA	16
1.4.3.2.4 EFECTOS DE LA LEPTINA EN LA MATRIZ EXTRACELULAR	17
1.4.3.2.5 EFECTOS PRO-INFLAMATORIOS DE LA LEPTINA	18
1.5 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR LEPTINA	19
1.5.1 Vía DE Jak/STAT.....	19
1.5.2 Vía DE LAS MAPK.....	21
1.5.2.1 Vía DE ERK1/2	22
1.5.2.2 Vía DE P38	23
1.5.3 Vía DE PI3K/Akt/mTOR	23
1.5.4 Vía DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC).....	24
1.5.5 Vía DE AMPc / FOSFODIESTERASAS.....	25
1.5.6 Vía DE Rho Y CITOESQUELETO DE ACTINA.....	25
1.5.7 Vía DEL NO.....	25
1.5.8 OTRAS VÍAS.....	26

1.6 LEPTINA Y PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR.....	27
1.7 LEPTINA Y OBESIDAD	30
1.7.1 OBESIDAD	30
1.7.2 RELACIÓN ENTRE LEPTINA Y OBESIDAD	31
1.7.3 RESISTENCIA A LA LEPTINA.....	32
1.8 OBESIDAD Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	36
1.9 PARADOJA DE LA OBESIDAD	40
2. HIPERTROFIA E INSUFICIENCIA CARDIACA.....	47
2.1 HIPERTROFIA CARDIACA.....	47
2.1.1 HIPERTROFIA CARDIACA A NIVEL CELULAR	48
2.1.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA HIPERTROFIA CARDIACA	50
2.1.2.1 CALCINEURINA- NFAT	50
2.1.2.2 PI3K/Akt/GSK3/mTOR	51
2.1.2.3 MEF2/HDAC	54
2.1.2.4 RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G	56
2.1.2.4.1 PROTEÍNAS Gq/G11	56
2.1.2.4.2 PROTEÍNAS Gs	57
2.1.2.4.3 PROTEÍNAS Gi.....	58
2.1.2.4.4 PROTEÍNAS G DE BAJO PESO MOLECULAR.....	59
2.1.2.5 MAPK	60
2.1.2.6 PKC	62
2.1.2.7 Gp130/STAT-3	62
2.1.2.8 MMP	63
2.1.3 PROGRAMA DE GENES HIPERTRÓFICOS	63
2.1.4 HIPERTROFIA FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA.....	64
2.1.4.1 HIPERTROFIA CONCÉNTRICA Y EXCÉNTRICA.....	65
2.1.4.2 CARACTERÍSTICAS DE LA HIPERTROFIA FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA	67
2.1.4.2.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES	67
2.1.4.2.2 METABOLISMO CARDIACO.....	68
2.1.4.2.3 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	68
2.2 INSUFICIENCIA CARDIACA	69
2.3 REMODELADO ELÉCTRICO EN HIPERTROFIA E INSUFICIENCIA CARDIACA	69
2.3.1 FISIOLÓGÍA DE LOS MIOCITOS CARDIACOS. POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO.....	69
2.3.2 CORRIENTES IÓNICAS IMPLICADAS EN EL PA	72
2.3.2.1 CORRIENTES DE SODIO (I_{Na}).....	72

2.3.2.2 CORRIENTES DE CALCIO	72
2.3.2.3 CORRIENTES DE POTASIO.....	73
2.3.2.4 CORRIENTES DE CLORO.....	74
2.3.2.5 CORRIENTE ACTIVADA POR HIPERPOLARIZACIÓN (I _f)	75
2.3.3 ASPECTOS GENERALES DEL REMODELADO ELÉCTRICO.....	75
2.3.4 CAMBIOS EN LA DURACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN	77
2.3.5 CAMBIOS EN LAS CORRIENTES DE CALCIO	77
2.3.6 INTERCAMBIADOR SODIO-CALCIO	78
2.3.7 REMODELADO DE LOS CANALES DE POTASIO.....	78
3. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN CARDIACO.....	83
3.1 CONTROL LOCAL DEL Ca ²⁺	84
3.2 ACTIVACIÓN DEL RS.....	85
3.2.1 CORRIENTE DE Ca ²⁺ TIPO L (I _{CaL})	85
3.2.2 OTRAS VÍAS	86
3.3 PAPEL DEL RS EN EL ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN.....	86
3.4 EL Ca ²⁺ DESPUÉS DE LA CONTRACCIÓN	87
3.5 HOMEOSTASIS DEL CALCIO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA	88
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	91
MATERIAL Y MÉTODOS	95
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	97
1.1 TRATAMIENTO CON LEPTINA IN VITRO	97
1.2 TRATAMIENTO CON LEPTINA IN VIVO.....	100
2. MÉTODO DE AISLAMIENTO DE MIOCITOS VENTRICULARES.....	101
3. ESTUDIOS DE ELECTROFISIOLOGÍA: TÉCNICA DE PATCH-CLAMP	103
3.1 TRATAMIENTO CON LEPTINA IN VITRO	105
3.2 TRATAMIENTO CON LEPTINA IN VIVO.....	113
4. DETERMINACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL	114
5. RT-PCR CUANTITATIVA.....	117
5.1 CONTROL INTERNO	118
5.2 DESARROLLO DE LA TÉCNICA.....	119
6. WESTERN BLOT	123
6.1 EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA Y MEDICIÓN DE LA PROTEÍNA	124
6.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y ELECTROFORESIS.....	125
6.3 ELECTROTRANSFERENCIA.....	127

6.4 INMUNODETECCIÓN	127
7. INMUNOPRECIPITACIÓN DE eNOS	130
8. DETERMINACIÓN DE LEPTINA MEDIANTE ELISA	131
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	132
10. COMPUESTOS UTILIZADOS	132
RESULTADOS	133
1. ESTUDIO DEL EFECTO PRO-HIPERTRÓFICO DE LEPTINA EN CARDIOMIOCITOS VENTRICULARES ADULTOS	135
1.1 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LEPTINA SOBRE EL TAMAÑO DE LOS CARDIOMIOCITOS.....	135
1.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm DE VARIOS GENES FETALES COMO MARCADORES DE LA HIPERTROFIA EN CARDIOMIOCITOS CONTROLES Y TRATADOS CON LEPTINA.....	137
1.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR LEPTINA EN CARDIOMIOCITOS ADULTOS.....	138
1.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR LEPTINA E IMPLICADAS EN SU EFECTO PRO-HIPERTRÓFICO	140
1.4.1 IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE Akt EN EL EFECTO PRO-HIPERTRÓFICO DE LEPTINA.....	140
1.4.2 IMPLICACIÓN DE LA VIA DE ERK1/2 EN EL EFECTO PRO-HIPERTRÓFICO DE LEPTINA.....	142
1.4.2.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PD98059 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE Akt.....	143
2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LEPTINA SOBRE EL REMODELADO ELÉCTRICO EN CARDIOMIOCITOS ADULTOS	147
2.1 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LEPTINA SOBRE LA EXPRESIÓN GENICA DE LAS SUBUNIDADES α DE LOS PRINCIPALES CANALES IMPLICADOS EN LA FASE DE REPOLARIZACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN.....	148
2.2 CARACTERIZACION DEL EFECTO DE LEPTINA SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE Kv4.2, Kv4.3 y KChIP2	149
2.3 CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LAS PRINCIPALES CORRIENTES REPOSABLES DE LA FASE DE REPOLARIZACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN.....	150
2.3.1 ANÁLISIS DE I_{K1} E I_{CaL}	150
2.3.2 ANÁLISIS DE LA I_{tof}	153
2.4 IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE Akt EN EL EFECTO DE LEPTINA SOBRE EL REMODELADO ELÉCTRICO	157
3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS CARDIACOS DE LEPTINA EN UN MODELO IN VIVO	161
3.1 PARAMETROS MACROSCÓPICOS.....	161
3.2 ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LOS MIOCITOS	162

3.3 RECEPTORES DE LEPTINA	163
3.4 NIVELES CARDIACOS DE LEPTINA	164
3.5 FUNCIÓN CARDIACA.....	165
3.6 ESTUDIO DEL ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN	166
3.6.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS TRANSITORIOS DE CALCIO	167
3.6.2 ANÁLISIS DE LA CARGA DEL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO	168
3.6.3 ANÁLISIS DE LOS SPARKS DE CALCIO.....	170
3.7 ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO	172
3.7.1 CORRIENTE DE CALCIO TIPO L (I_{CaL}).....	172
3.8 INTERCAMBIADOR Na^+/Ca^{2+} (NCX).....	173
3.9 NIVELES DE FOSFORILACIÓN DEL FOSFOLAMBANO (PLB).....	174
3.10 CANAL DE RIANODINA	175
3.11 POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS EN EL EFECTO INOTRÓPICO NEGATIVO DE LEPTINA	177
3.11.1 POSIBLE IMPLICACIÓN DE eNOS	177
DISCUSIÓN.....	181
1. EFECTO PRO-HIPERTRÓFICO DE LEPTINA	183
2. EFECTO DE LEPTINA SOBRE EL REMODELADO DE LOS CANALES IÓNICOS CARDIACOS.....	186
3. EFECTO DE LA LEPTINA SOBRE EL ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN- CONTRACCIÓN EN UN MODELO <i>IN VIVO</i>	190
CONCLUSIONES	199
BIBLIOGRAFÍA	203

INTRODUCCIÓN

LEPTINA

1. LEPTINA.

1.1 ASPECTOS GENERALES

La leptina es la principal hormona implicada en el control de la ingesta y el gasto energético. Su descubrimiento data del año 1953 cuando Kennedy y sus colaboradores propusieron la existencia de factores circulantes liberados por el tejido adiposo capaces de regular las reservas de grasa en el organismo [1]. Sin embargo, creían que estos factores eran metabolitos y no hormonas. Más tarde, Hervey en 1958 demostró la existencia de un factor circulante capaz de regular el metabolismo energético [2] pero no fue hasta 1973 cuando Coleman se hizo eco de estos trabajos, aportando modelos animales que confirmaban la existencia de dicho factor [3], que en 1994 se identificó como una hormona que recibió el nombre de leptina [4].

La leptina cuyo nombre deriva del griego leptos (delgado) es una proteína plasmática de 16 kDa, constituida por 147 aminoácidos en su estado maduro. El gen de la leptina o gen OB, que se encuentra en el cromosoma 7 en el humano y en el cromosoma 6 en el ratón y la rata [4] cuenta con tres exones y dos intrones, así como con una única región para la unión de factores de transcripción. Presenta una gran homología entre especies, siendo de un 84% la homología de la leptina humana con la del ratón y un 83% con la de la rata. Por su estructura terciaria, con cuatro hélices, se clasifica como una citoquina de clase I [5]. Su distribución a nivel subcelular es igual en ratas obesas y delgadas [6] observándose en el citosol, pero no en el núcleo celular.

La leptina se denomina a menudo como la hormona del tejido adiposo y se considera como tal porque se sintetiza y se secreta al torrente sanguíneo desde una glándula endocrina, ejerce su efecto en un órgano distal y posee un ritmo circadiano y una secreción pulsátil. Se sintetiza principalmente en tejido adiposo blanco y en menor medida en otros tejidos como el tejido adiposo marrón, el hígado, el estómago, la placenta e incluso en el tejido miocárdico [7, 8]. En el torrente sanguíneo se encuentra libre o unida a proteínas plasmáticas que modulan su metabolismo, biodisponibilidad y la respuesta del tejido diana a la unión de leptina con su receptor. Sus niveles plasmáticos oscilan entre 5-15 ng/ml en individuos con normopeso y más de 100 ng/ml en individuos obesos, en los que a diferencia de lo que ocurre en los individuos normopeso, los niveles de leptina libres son más elevados que los niveles de leptina unida a proteínas [9]. Puesto que en sujetos normopeso predomina la forma unida a proteínas, mientras que en individuos obesos la forma predominante es

la forma libre, se ha sugerido que la forma biológicamente activa es la forma libre [9]. Su secreción está influida por diferentes factores: la edad, las dietas grasas, la insulina o los glucocorticoides aumentan la secreción de leptina, mientras que el ayuno, el ejercicio físico, el calor o la estimulación adrenérgica la disminuyen [9-12].

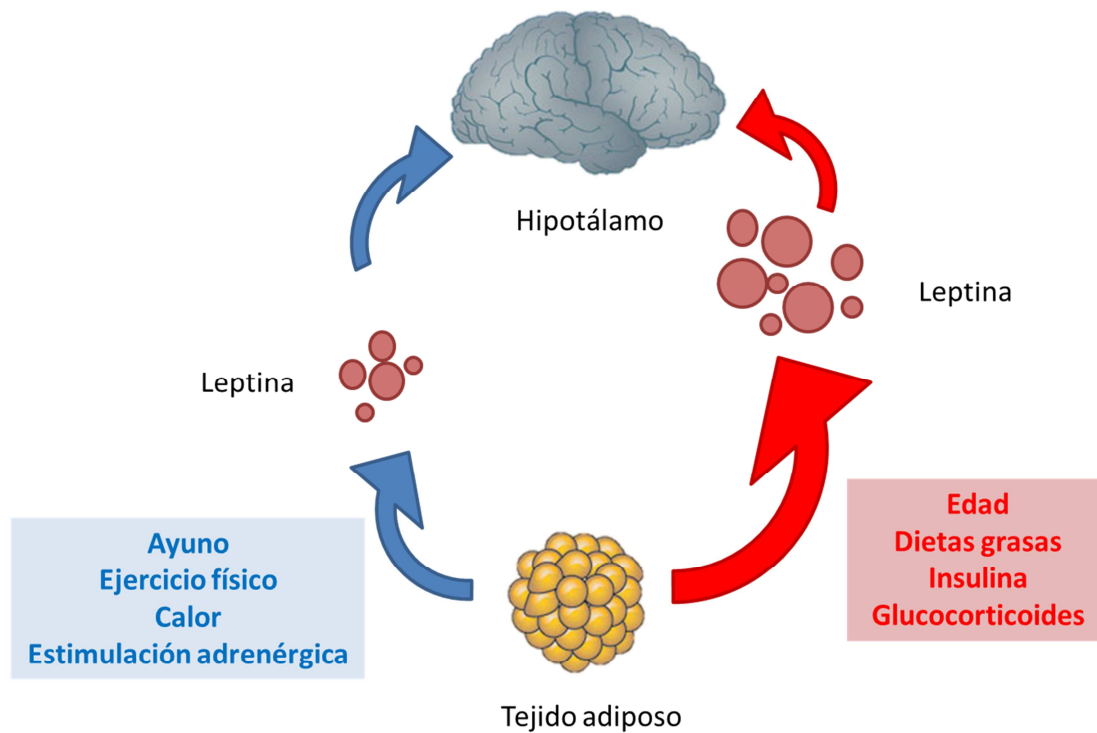


Figura 1. Factores moduladores de la secreción de leptina

1.2 RECEPTOR DE LEPTINA

El receptor de leptina (Ob-R) fue identificado en 1995 como una proteína de membrana similar a los receptores de citoquinas de clase I puesto que necesita la unión a proteínas de la familia Jak para ejercer su función por no tener una actividad quinasa *per se* [13]. Hasta la fecha, se han identificado 6 isoformas del receptor de leptina (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re y Ob-Rf). Todas ellas constan de un dominio extracelular, el cual contiene el sitio de unión de leptina, un dominio transmembrana, común a todos ellos excepto a la isoforma soluble, que constituye el sitio de anclaje del receptor a la membrana celular, y un dominio intracelular, que es el que difiere entre las distintas isoformas y que permite clasificarlas en cortas (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd y Ob-Rf), larga (Ob-Rb) y soluble (Ob-Re) [13].

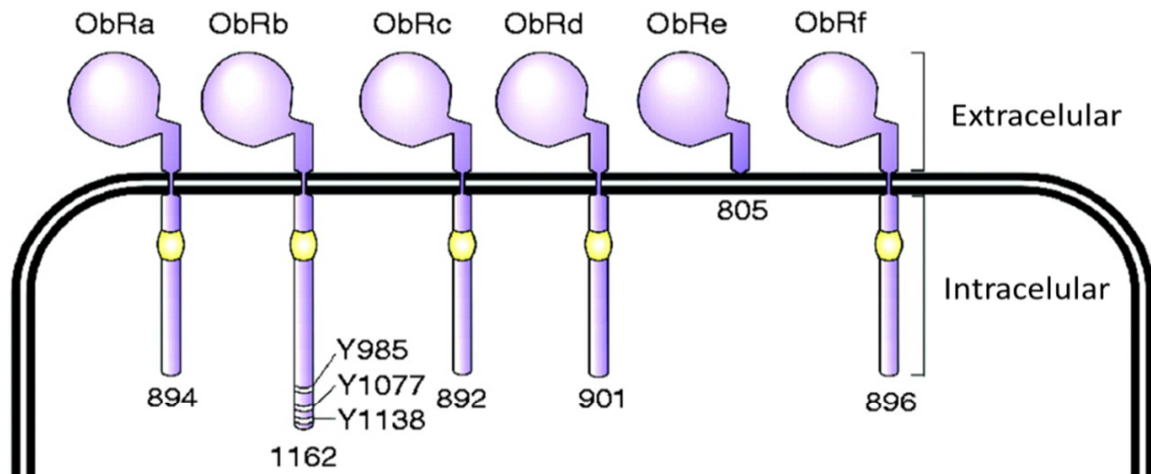


Figura 2. Isoformas del receptor de Leptina. (Modificado de Marroquí et al. 2012)

La isoforma soluble del receptor (Ob-Re) es la más corta, carece de las regiones transmembrana y citosólica y circula en el torrente sanguíneo donde suele encontrarse unida a leptina en forma libre [14]. De esta forma actúa como tampón y regulador de los niveles de leptina libre circulantes [15, 16].

La isoforma larga, Ob-Rb, es la única que contiene todos los elementos necesarios para poner en funcionamiento todos los mecanismos de señalización intracelular activados por leptina, tiene la región citoplasmática más larga y contiene las regiones BOX-1 y BOX-2, por lo que se considera la isoforma funcional del receptor [17]. Alteraciones en la expresión de la isoforma larga del receptor de leptina se asocian con la obesidad, resistencia a la insulina e insuficiencia cardíaca [18-20].

Las isoformas cortas se distinguen entre sí en función de la longitud de su región citoplasmática, el Ob-Ra cuenta con 34 aminoácidos en su región citoplasmática, mientras que Ob-Rc contiene 32 y Ob-Rd contiene 40 y solamente contienen la región BOX-1. Las isoformas cortas del receptor son capaces de reclutar proteínas Jaks [21] y están relacionadas con la internalización y degradación de leptina [22, 23] así como con el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica y del plexo coroideo al cerebro [23].

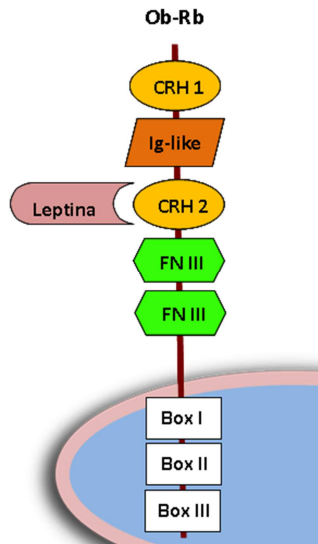


Figura 3. Receptor de leptina OB-Rb. (Modificado de Bernotiene et al. 2006)

El receptor de leptina se ha detectado en diferentes tejidos como el hipotálamo, y otras regiones del Sistema Nervioso Central [24], el bazo, el riñón, el tejido adiposo, el hígado, el músculo esquelético [25-27] y en el miocardio, donde se ha detectado la expresión de las isoformas Ob-Ra y Ob-Rb, sugiriéndose un efecto directo de leptina en el corazón [7].

Los receptores de leptina, igual que todos los receptores de la familia de las citoquinas se internalizan cuando se unen a su ligando a través de unas vesículas cubiertas de clatrina, donde el receptor o bien se procesa para su degradación o se recicla de nuevo a la membrana [28].

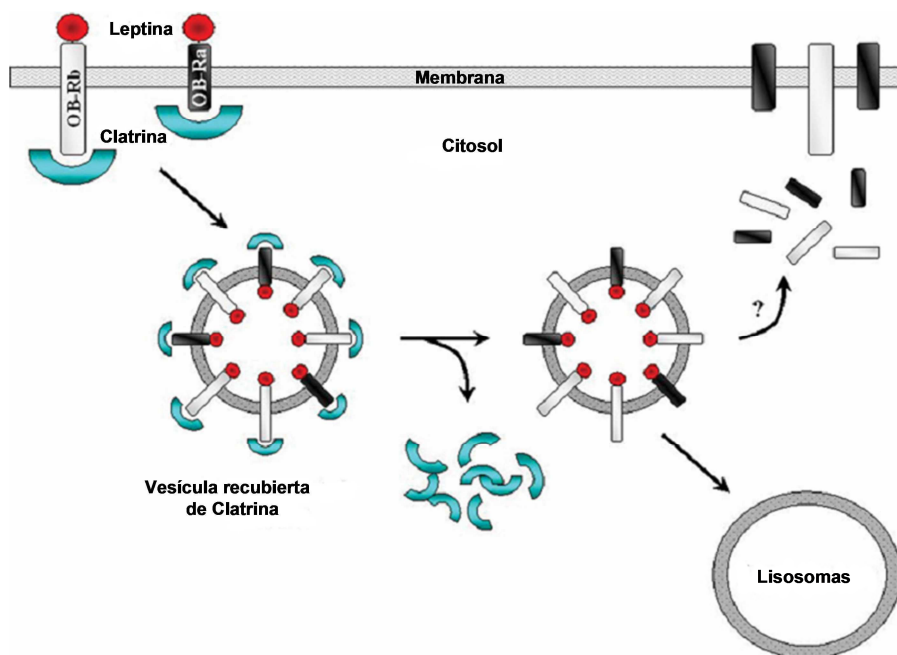


Figura 4. Internalización del receptor de leptina. (Modificado de Frühbeck G et al. 2006)

1.3 REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LEPTINA

La secreción de leptina se estimula tras la ingesta de alimentos y disminuye durante el ayuno. Entre los reguladores positivos de la secreción de leptina más importantes se encuentran la insulina, los glucocorticoides y los estrógenos, mientras que los principales reguladores negativos de la síntesis de leptina son los andrógenos, los ácidos grasos de cadena larga y las catecolaminas a través de receptores β_3 adrenérgicos [29-32].

Entre los reguladores positivos de la síntesis y secreción de leptina, el más importante es la insulina [33]. La insulina, es capaz de aumentar la síntesis y secreción de leptina en el tejido adiposo blanco mediante la estimulación de su transporte desde el retículo sarcoplásmico al exterior celular [34]. Esta hiperleptinemia inducida por la insulina favorece, a su vez, la utilización de glucosa y mejora la sensibilidad de distintos tejidos a la insulina, por lo que leptina ha sido considerada una hormona antidiabética [35].

La síntesis de leptina puede ser estimulada por otras vías. La activación de Akt, a su vez puede conducir a un incremento de unas 20 veces en la producción y secreción de leptina mediante mecanismos no transcripcionales [36].

Por el contrario, los agonistas β_3 adrenérgicos, inhiben la producción de leptina en el tejido adiposo blanco y marrón [37]. El Sistema Nervioso Simpático, a través de los receptores β adrenérgicos, ejercen el control mayoritario de la síntesis de leptina en el tejido adiposo. Las catecolaminas, a través del receptor β_3 , inhiben la síntesis de leptina e incrementan la lipólisis en el tejido adiposo blanco y la producción de calor en el marrón. La leptina secretada, a su vez, produce una activación del Sistema Nervioso Simpático, estableciéndose así un sistema de regulación de la síntesis de leptina [37].

1.4 EFECTOS DE LA LEPTINA

La principal función de la leptina es el control de la ingesta y el gasto energético, para lo cual ejerce acciones tanto a nivel central como a nivel periférico

1.4.1 EFECTOS CENTRALES DE LA LEPTINA

A nivel central, leptina actúa de forma directa sobre el núcleo paraventricular disminuyendo la expresión de péptidos orexigénicos como el neuropéptido Y (NPY) y AgRP (agouti related protein) y aumentando la expresión de péptidos anorexigénicos como el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) y la proopiomelanocortina (POMC) [38, 39]. Además, de una forma indirecta, leptina es capaz de aumentar la actividad simpática, dando lugar a un aumento de la lipólisis, la termogénesis y el gasto energético [40, 41].

La leptina, asimismo, es capaz de producir un incremento del malonil CoEnzima A (malonil CoA) en el hipotálamo. El malonil CoA, es otro sustrato relacionado con el control de la ingesta. Un incremento de la síntesis de malonil CoA hipotalámico es capaz de modular la expresión de péptidos orexigénicos y anorexigénicos para reducir la ingesta [42]. Además, un incremento del malonil-CoA en el hipotálamo también se asocia con una mayor β -oxidación de ácidos grasos en tejidos periféricos. De esta forma, leptina, a través de la estimulación de la expresión del malonil-CoA, es capaz de producir un control de la ingesta y un aumento del gasto energético a nivel periférico [43].

1.4.2 EFECTOS PERIFÉRICOS DE LA LEPTINA

A nivel periférico, leptina también es capaz de promover un incremento del gasto energético. En células pancreáticas [44], en adipocitos y en hepatocitos [45], leptina aumenta la β -oxidación y disminuye la esterificación de ácidos grasos. En el tejido adiposo, se ha observado que es capaz de estimular la lipólisis en ratones deficientes en leptina (ob/ob). Sin embargo, en ratones con una depleción en el receptor de leptina (db/db), la leptina es incapaz de causar el mismo efecto [46], lo cual demuestra que este efecto se debe a la unión de la leptina a su receptor.

En el músculo esquelético, leptina también es capaz de inducir un incremento en la oxidación de ácidos grasos a través de un mecanismo que implica la activación de la AMPK mediante la fosforilación de su subunidad catalítica $\alpha 2$ [41]. A este nivel, leptina también mejora la respuesta a insulina al disminuir la acumulación de triglicéridos [47].

En el corazón, leptina también favorece la β -oxidación, sin embargo, en este caso a través de mecanismos tanto dependientes de AMPK [48] como independientes de AMPK [49] mediante la

reducción de la actividad de la piruvato deshidrogenasa (PDH), que conduce a una disminución de la oxidación del piruvato [50] y de esta forma a un aumento de la β -oxidación.

1.4.3 EFECTOS DE LEPTINA EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

1.4.3.1 EFECTOS VASCULARES DE LEPTINA

1.4.3.1.1 EFECTOS HIPERTENSIVOS

La obesidad se relaciona con un mayor riesgo de hipertensión y existe una fuerte correlación positiva entre la presión arterial y los niveles circulantes de leptina [51]. Una explicación posible para esta correlación es que la resistencia a leptina que se produce en la obesidad es selectiva a la regulación hipotalámica del control de la ingesta y no afecta a la capacidad de leptina para activar el sistema simpático a nivel central. Esta activación simpática tendría como consecuencias efectos a nivel periférico tales como un aumento de la actividad del sistema presor y una disminución renal de la natriuresis, que pueden contribuir a la hipertensión [52].

1.4.3.1.2 EFECTOS ATEROSCLERÓTICOS

La leptina puede incrementar y acelerar la aterosclerosis a través de varios mecanismos, incluyendo la estimulación del reclutamiento de monocitos en la capa íntima, la transformación de macrófagos, la proliferación de células del músculo liso vascular y la secreción de citoquinas proaterogénicas [53]. Asimismo, produce de forma directa un aumento de la aterosclerosis en modelos de ratones K.O para la apolipoproteína E y, además, los receptores de leptina se encuentran aumentados en las zona de lesión aterosclerótica. Por otro lado, varios modelos de ratones ob/ob muestran resistencia al desarrollo de aterosclerosis [53].

Pero como ocurre con otros efectos cardiovasculares de leptina, los datos publicados hasta la fecha sugieren que leptina también puede tener un efecto protector frente a la aterosclerosis. Por ejemplo, en ratones K.O para el receptor de LDL, la ausencia de leptina (ob/ob) produce un mayor grado de aterosclerosis que en los ratones que tienen leptina [54].

1.4.3.1.3 EFECTOS SOBRE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

La disfunción endotelial se ha descrito como un precursor de la enfermedad aterosclerótica. Aunque existen numerosos estudios que indican que leptina puede mediar este proceso, hay que señalar que la disfunción endotelial inducida por leptina ocurre frecuentemente cuando se utilizan concentraciones muy por encima de las concentraciones fisiológicas de esta citoquina. Sin embargo, también cabe destacar que leptina puede causar un desajuste en el balance NO/ONOO-característico de la disfunción endotelial [55].

1.4.3.1.4 EFECTOS SOBRE LA FORMACIÓN DE TROMBOS

La formación de un trombo es la causa principal de eventos coronarios agudos, en particular en individuos obesos [56]. Varios estudios han demostrado que leptina puede incrementar la agregación plaquetaria de forma dosis-dependiente, de forma que solo niveles altos de leptina son pro-trombóticos [57]. De hecho, las plaquetas de los pacientes obesos son más sensibles a leptina y presentan incrementada la agregación inducida por adenosindifosfato (ADP) en comparación con los pacientes delgados [58].

También se han encontrado evidencias del efecto pro-trombótico de leptina en modelos animales, por ejemplo, en los ratones ob/ob se observan niveles más bajos de formación de trombos, que aumentan cuando se suplementan estos animales con leptina [59, 60].

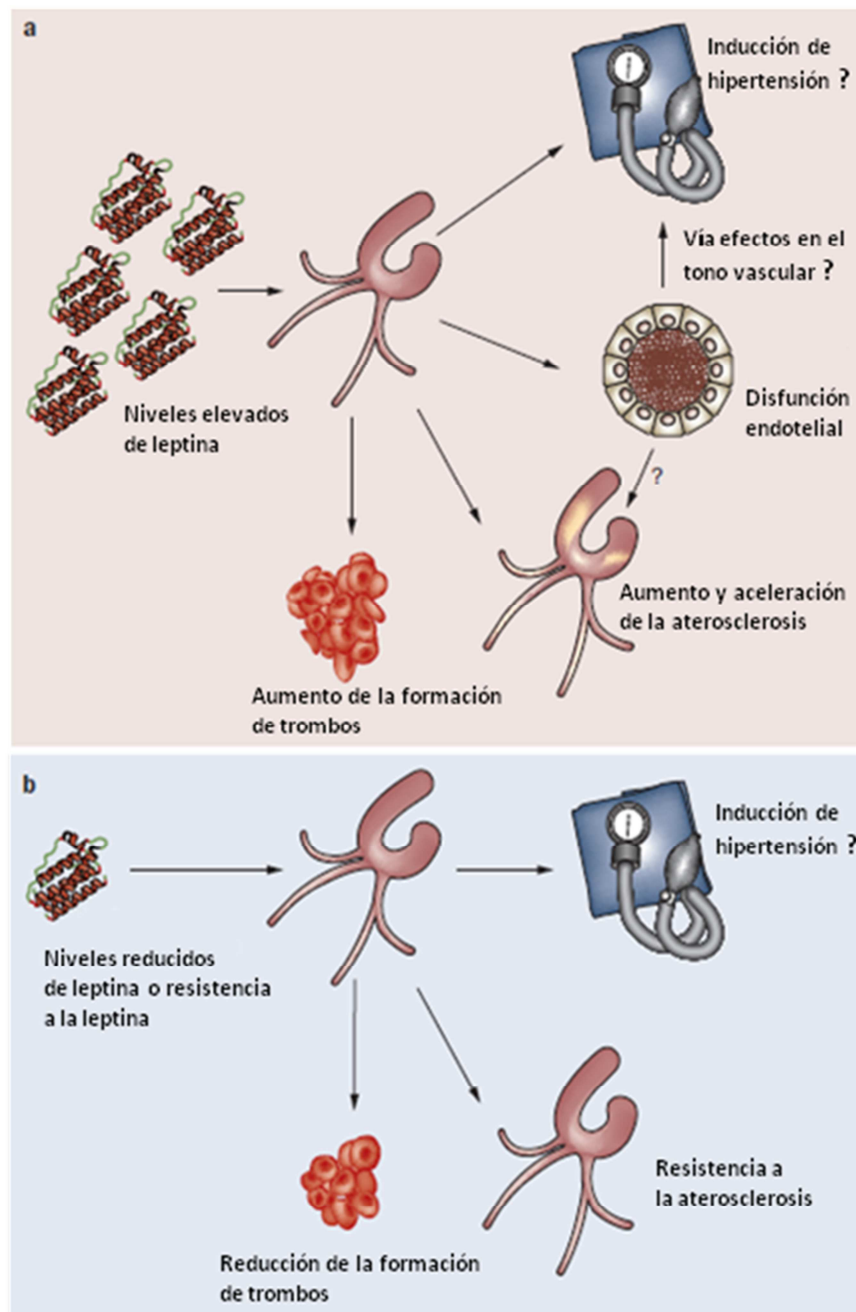


Figura 5. Efectos vasculares de leptina. (Modificado de Sweeney G, 2010)

1.4.3.2 EFECTOS CARDIACOS DE LEPTINA

1.4.3.2.1 EFECTOS DE LEPTINA EN EL METABOLISMO CARDIACO

La leptina es capaz de modular el metabolismo cardiaco, fundamentalmente a tres niveles: aumentando la oxidación de ácidos grasos, modulando la captación de glucosa y ejerciendo efectos antilipotóxicos a nivel del miocardio.

Leptina y oxidación de ácidos grasos

La β -oxidación de ácidos grasos es la principal fuente de energía del corazón sano, constituyendo aproximadamente un 70% de la generación de ATP en condiciones de normoxia. Actualmente, existen evidencias de que leptina puede modular el metabolismo de los ácidos grasos en el corazón, sin embargo, existe discrepancia acerca de la naturaleza de esos efectos. En células HL-1 de ratón, el tratamiento con leptina durante una hora aumenta de forma significativa la β -oxidación de ácidos grasos, mientras que el tratamiento con leptina durante 24 horas disminuye la oxidación de los mismos conduciendo a un posible aumento de la acumulación de lípidos intracelulares y a su vez pudiendo resultar en un potencial aumento de la lipotoxicidad cardiaca [48]. El curso temporal de los efectos de leptina en las células HL-1, así como el análisis del curso temporal de la actividad de la AMPK, sugieren una implicación de la misma en este efecto de leptina a nivel miocárdico. Sin embargo, en un estudio realizado en corazón de rata ex vivo, se ha demostrado que el incremento en la oxidación de ácidos grasos inducido por leptina es independiente de AMPK [49]. Este incremento en la oxidación de ácidos grasos, se asocia con una disminución en la eficiencia cardiaca y un aumento del consumo miocárdico de oxígeno.

Leptina y captación de glucosa

En el miocardio sano, los hidratos de carbono como la glucosa, se convierten en el principal sustrato para la obtención de energía durante periodos anaeróbicos o de estrés metabólico. Existen numerosos estudios que demuestran la importancia de leptina en la regulación de la homeostasis de la glucosa en diferentes tipos celulares [41, 61-63], sin embargo, no está claro si leptina es capaz de afectar la captación de hidratos de carbono. Se ha observado que leptina es capaz de estimular la captación de glucosa en corazones aislados de rata, perfundidos mediante un sistema de Langendorff [63], sin embargo, el tratamiento con leptina no produce ningún efecto en la captación de glucosa en células HL-1 ni en condiciones basales, ni en células estimuladas con insulina [48].

Leptina como agente antilipotóxico y cardioprotector

La lipotoxicidad cardiaca ocurre cuando la captación de ácidos grasos excede la capacidad oxidativa del miocardio [64]. La acumulación de lípidos en el músculo cardiaco, puede tener múltiples efectos deletéreos que incluyen insuficiencia cardiaca en individuos obesos y pacientes

con diabetes mellitus [65], fallos en la función contráctil del corazón [66], apoptosis y alteraciones en la señalización celular y la función de la membrana celular [67].

Estudios recientes han demostrado que leptina puede ejercer efectos beneficiosos a nivel miocárdico limitando la lipotoxicidad. Por ejemplo, leptina puede regular la lipotoxicidad en tejidos periféricos [68-70] incluyendo el corazón [71]. En ratones alimentados con una dieta grasa, se ha observado que las concentraciones plasmáticas de leptina aumentan a las 24 horas de la administración de la dieta y que dicho aumento de leptina se asocia con una acumulación mínima de lípidos en el corazón, sugiriendo este dato un efecto beneficioso de leptina [68]. Además, modelos de ratones deficientes en leptina muestran una regulación deficiente del metabolismo lipídico en órganos periféricos. En ratones con una deficiencia de la secreción de leptina (ob/ob), o con una mutación del receptor db/db o fa/fa, se han observado depósitos ectópicos de lípidos en tejidos no adiposos, que conducen a una disfunción celular [66, 70, 72]. Además, en ratas Zucker obesas y diabéticas, se ha observado una disfunción contráctil en el miocardio debida a un aumento de la captación de ácidos grasos y una disminución de la oxidación de los mismos [72]. También se ha observado una alteración contráctil debida a lipotoxicidad en ratones ob/ob [66].

Sin embargo, aunque la mayoría de estudios realizados hasta la fecha sugieren que leptina tiene un efecto antilipotóxico, existen otros estudios que muestran que el tratamiento crónico con leptina aumenta la captación de ácidos grasos, disminuye la oxidación y conduce a lipotoxicidad en células HL-1 [48].

1.4.3.2.2 EFECTOS DE LEPTINA EN LA APOPTOSIS CELULAR

La apoptosis de los cardiomiocitos juega un papel crucial en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, especialmente en la transición de un remodelado cardiaco compensatorio a la insuficiencia cardiaca [73]. Existen evidencias de que se produce muerte de los cardiomiocitos mediante la activación de las rutas de apoptosis en biopsias endomiocárdicas de pacientes con cardiomiopatía dilatada o isquémica en estadios finales de la insuficiencia cardiaca [74, 75]. Además los cardiomiocitos aislados de corazones de pacientes con insuficiencia cardiaca presentan más susceptibilidad a la apoptosis inducida por hipoxia [76].

En estas situaciones, leptina puede proteger a los cardiomiocitos de la apoptosis inducida por hipoxia-reoxigenación o por H_2O_2 [77, 78], así como de la apoptosis inducida por isquemia crónica in vivo [79].

Por otro lado, existen cada vez más evidencias de que la apoptosis es un factor importante en la disfunción miocárdica y mortalidad temprana que se produce en los ratones deficientes en leptina o en su receptor [80, 81]. Además, la administración de leptina parece reducir el área de infarto tras la isquemia-reperfusión ex vivo [82] y a través de la vía de Akt y ERK1/2, leptina también disminuye el tamaño del infarto en corazones aislados de ratas control sometidas a isquemia-reperfusión, pero no en ratas Zucker deficientes en el receptor de leptina [20].

En conjunto, estos datos sugieren que leptina tiene efectos antiapoptóticos en el tejido miocárdico

1.4.3.2.3 EFECTOS PRO-HIPERTRÓFICOS DE LEPTINA

La hipertrofia es una de las primeras respuestas del corazón a una sobrecarga e inicialmente es un mecanismo compensatorio [83, 84]. El ejemplo clásico de este tipo de hipertrofia compensada es el que aparece en atletas de alto nivel [85, 86]. Sin embargo, cuando se produce una sobrecarga crónica, la hipertrofia se convierte en maladaptativa y contribuye a la progresión hasta insuficiencia cardíaca [83, 84].

Varios estudios han sugerido que leptina de forma directa puede inducir hipertrofia en cardiomiocitos pediátricos humanos y neonatales de roedores [87-96]. Consecuentemente, se han propuesto varios mecanismos capaces de mediar la hipertrofia inducida por leptina en cardiomiocitos neonatales de rata a través de las vías de angiotensina y endotelina, de especies reactivas de oxígeno, de los receptores PPAR α o de la vía de Akt y mTOR entre otros [93, 97].

En consonancia con estos datos, un aumento de los niveles circulantes de leptina debidos a una obesidad inducida por la dieta en ratones C57BL/6J se correlacionan con un menor acortamiento del ventrículo y un engrosamiento de la pared posterior del ventrículo izquierdo al final de la diástole [98].

Sin embargo, existen también estudios que señalan que leptina podría tener efectos anti-hipertróficos ya que una infusión de leptina a ratones ob/ob (deficientes en leptina) que presentan hipertrofia del ventrículo izquierdo, es capaz de disminuir el engrosamiento de la pared posterior del ventrículo izquierdo [99].

Para complicar aún más el escenario, en un estudio en ratones ob/ob sometidos a constricción aórtica se ha observado que los ratones ob/ob, a diferencia de los controles, presentan una menor activación de factores de transcripción nuclear como el NFATc4 y de otros factores relacionados con la hipertrofia como el ANF, a pesar de que muestran mayor grado de hipertrofia que los ratones controles [100]. En conjunto, todos estos datos sugieren que la regulación de la hipertrofia cardiaca por leptina es compleja y puede implicar vías de señalización atípicas.

Referencia	Concentración de Leptina	Tipo celular	Resultado
Rajapurohitam et al. 2003	50 ng/ml	Cardiomiocitos neonatales de rata	Hipertrofia dependiente de la activación de la MAPK p38
Xu et al. 2004	100 ng/ml	Cardiomiocitos neonatales de rata	Hipertrofia dependiente de la vía de Endotelina-1 y especies reactivas de oxígeno
Tajmir et al. 2004	100 ng/ml	HL-1 y miocitos pediátricos humanos	Aumento de la proliferación celular a través de las vías de PI3K y ERK
Rajapurohitam et al. 2006	Leptina endógena	Cardiomiocitos neonatales de rata	Leptina media los efectos hipertróficos de angiotensina II y endotelina I
Zeidan et al. 2006	50 ng/ml	Cardiomiocitos neonatales de rata	Hipertrofia dependiente de la activación de RhoA/ROCK y de la dinámica de la actina
Abe et al. 2007	50 ng/ml	Cardiomiocitos neonatales de rata	Hipertrofia dependiente de la vía de JAK/STAT
Zeidan et al. 2008	50 ng/ml	Cardiomiocitos neonatales de rata	Hipertrofia dependiente de la translocación al núcleo de p38 y de lipid rafts/caveolas y RhoA
Zeidan et al. 2011	50 ng/ml	Cardiomiocitos neonatales de rata	Hipertrofia dependiente de la vía de PI3K/Akt/mTOR/P70S6K
Rajapurohitam et al. 2012	50 ng/ml	Cardiomiocitos neonatales de rata	Hipertrofia dependiente de la vía de calcineurina

Tabla 1. Resumen de los estudios que demuestran un efecto pro-hipertrófico de leptina

1.4.3.2.4 EFECTOS DE LEPTINA EN LA MATRIZ EXTRACELULAR

Los principales componentes de la matriz extracelular cardiaca se suelen describir como estructurales (por ejemplo el colágeno y las fibras elásticas) y adhesivos (como la fibronectina y la laminina). Alteraciones en la composición y estructura de la matriz extracelular tienen como consecuencia cambios en el tamaño del corazón y en su estructura y función [101]. Los efectos de leptina en los componentes de la matriz extracelular en el sistema cardiovascular permanecen

relativamente inexplorados. Hasta la fecha, solo unos pocos estudios han dado evidencia de que leptina puede influir en el remodelado de la matriz [101].

Tanto los cardiofibroblastos como los cardiomiocitos contribuyen de manera sustancial, pero diferente, en la síntesis de la matriz extracelular y en su regulación. En cardiomiocitos ventriculares pediátricos humanos, leptina incrementa el procolágeno tipo III y tipo IV y disminuye el procolágeno tipo I, pero no modifica la síntesis total del colágeno [87].

En cardiomiocitos neonatales de rata, la exposición a leptina produce un incremento de los niveles de procolágeno tipo I intracelulares y secretados al exterior celular, mientras que se disminuyen los niveles de procolágeno tipo III [102]. Por otro lado, se ha descrito que en los corazones de ratones ob/ob y ratas Zucker, se produce un incremento de la fibrosis [103-105]. Además, se ha demostrado que leptina puede estimular de manera directa la expresión y actividad de la MMP2 en miofibroblastos cardiacos neonatales de rata [87] y que este efecto está mediado en parte por la vía de señalización de la MAPK p38.

1.4.3.2.5 EFECTOS PRO-INFLAMATORIOS DE LEPTINA

Las consecuencias de la inflamación en el sistema cardiovascular están bien establecidas y numerosos estudios han correlacionado niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias con un pronóstico adverso a nivel cardiovascular. En particular, los factores inflamatorios producidos por las células del miocardio (cardiomiocitos, células endoteliales, fibroblastos y células de músculo liso) y por los leucocitos, plaquetas y macrófagos infiltrados pueden tener un efecto importante en la estructura y función del miocardio, así como una inflamación sistémica puede influir en la función vascular [106-108].

La leptina es un mediador de la inflamación e incluso se ha propuesto que puede interaccionar con la proteína C reactiva, aunque la explicación de este fenómeno aún es materia de controversia. Además, los receptores Toll like parecen tener un papel fundamental en la regulación de la inflamación y leptina es un regulador potente de la expresión de estos receptores [109].

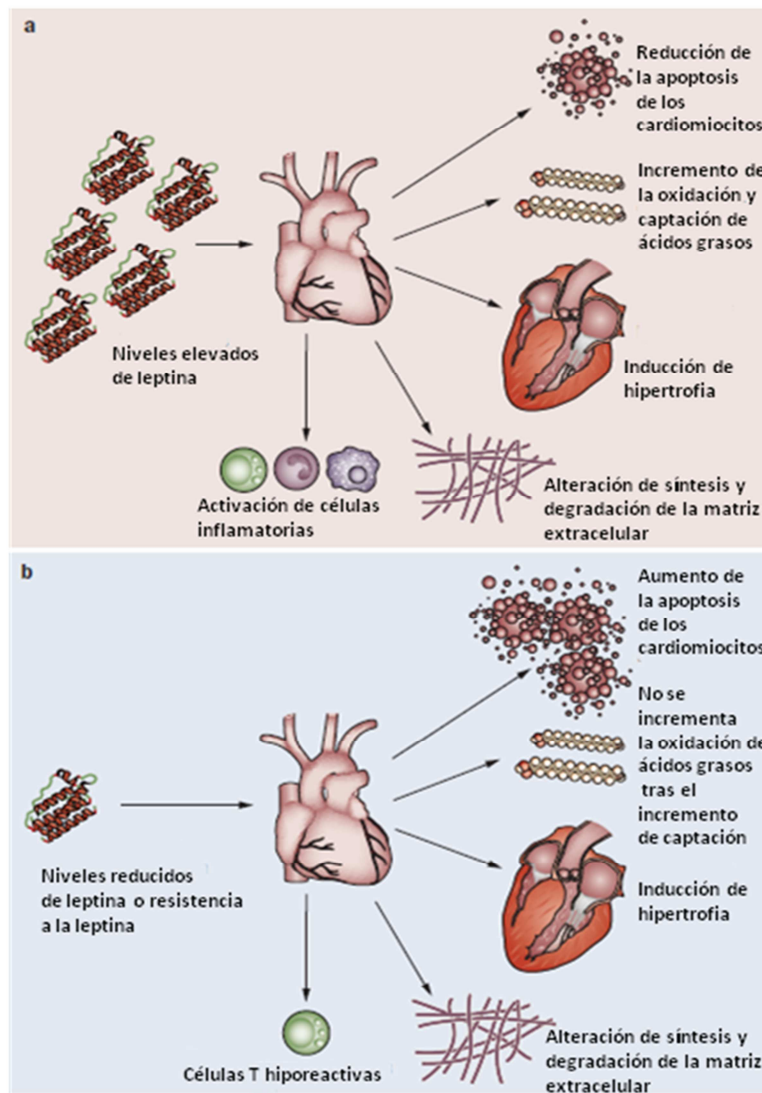


Figura 6. Efectos cardíacos de leptina. (Modificado de Sweeney G, 2010)

1.5 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR LEPTINA

El receptor de leptina, igual que los receptores de citoquinas de clase I, ejerce sus efectos a través de una tirosina quinasa de la familia de Jak. La unión de leptina con su receptor activa Jak quinasas que median numerosos efectos, entre ellos la activación de factores de transcripción como STAT3 [110-112]. Pero además, el receptor de leptina puede activar otras vías de señalización.

1.5.1 VÍA DE Jak/STAT

Debido a la homología del receptor de leptina con otros receptores de la familia de las citoquinas de clase I, se ha sugerido que podría activar vías de señalización similares a estos receptores, como la de Jaks/STAT [110, 113, 114].

La vía de Jak/STAT comprende una familia de 4 tirosina quinasas (Jaks) y 7 factores de transcripción de entre 85 y 95 kDa (STAT) que se regulan mediante la fosforilación de residuos específicos de serina y tirosina.

Con frecuencia, la cascada de Jak/STAT se activa por interferones, interleuquinas u otras citoquinas cuyos receptores no tienen actividad quinasa intrínseca. Los receptores de citoquinas contienen una región rica en prolinas conocida como BOX1 que es necesaria para la interacción con Jak y su activación [115, 116]. Además, otras secuencias menos conservadas, conocidas como BOX2, también juegan un papel en las interacciones de Jak y en la selectividad por una isoforma determinada. De los cuatro miembros conocidos de la familia de Jak, Jak1, Jak2 y TYK2 (de sus siglas en inglés tyrosine kinase 2) se expresan de forma ubicua, mientras que Jak3 solo se encuentra en células del sistema inmune hematopoyético [115].

El receptor de leptina OB no tiene un dominio tirosina quinasa intrínseco, y por este motivo se une a quinasas citoplasmáticas, principalmente Jak2 [117]. Las regiones BOX1 y BOX2 reclutan y se unen a Jak [21, 118]. Sin embargo, en la señalización por leptina, se ha observado que solo la región BOX1 y los aminoácidos de alrededor son esenciales para la activación de Jak [119, 120].

El dominio intracelular de todas las isoformas del receptor de leptina contienen en la yuxtamembrana la región BOX1, el lugar de unión de Jak. Sin embargo, solo el OB-Rb contiene también la región BOX2, el lugar de unión de STAT. Inicialmente solo el receptor OB-Rb se consideró la isoforma con capacidad de señalización pero las isoformas cortas también han mostrado capacidades de señalización divergentes [24, 121-124].

Como se ha descrito previamente, el dominio intracelular del receptor de leptina únicamente activa a Jak2, pero no a Jak1 o TYK2 [121]. Puesto que el receptor OB-Rb no tiene una actividad enzimática intrínseca, señala a través de la activación de Jak2, a la que se encuentra unido de forma no covalente y que se autofosforila en varios residuos de tirosina de forma simultánea a la vez que fosforila residuos tirosina en el receptor OB funcional.

Las proteínas Jak2 se asocian con secuencias próximas a la membrana del dominio intracelular del receptor, que se fosforila al unirse a su ligando. El dominio intracelular fosforilado se une a proteínas STAT, que se activan, se translocan al núcleo y estimulan la transcripción.

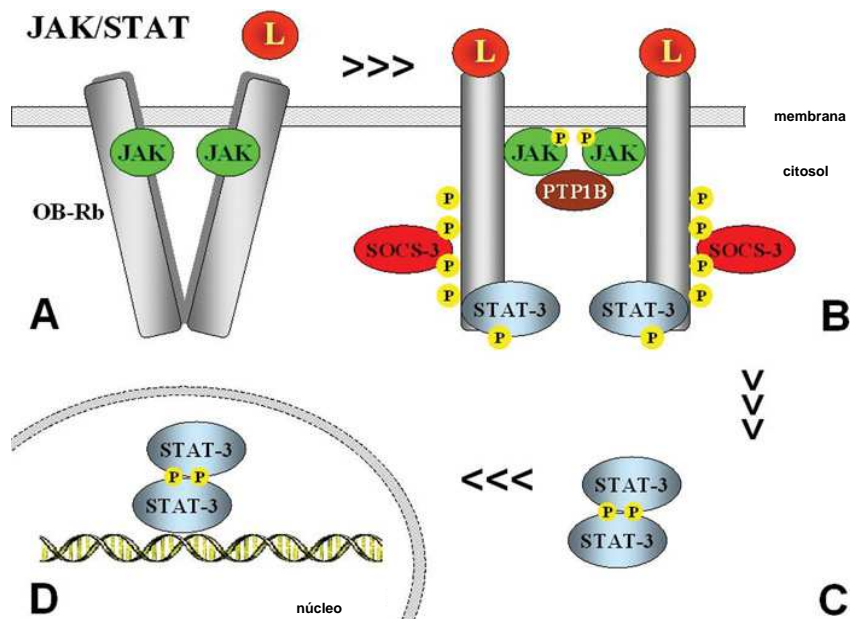


Figura 7. Activación de STAT3 inducida por la unión de leptina a su receptor. (Modificado de Frühbeck G et al. 2006)

Se ha descrito que la unión de leptina a su receptor resulta en la activación de STAT3, STAT5 y STAT6, pero no STAT1, STAT2 o STAT4 [28]. A nivel cardíaco, la activación de la vía de STAT-3 se ha relacionado con la hipertrofia inducida por leptina en cardiomiocitos neonatales de rata [96] y con los efectos cardioprotectores de leptina frente al daño por isquemia y reperfusión a través de mecanismos que implican una disminución de la apoptosis [125] y una disminución de la permeabilidad mitocondrial [126].

1.5.2 VÍA DE LAS MAPK

La familia de las MAPK (Proteína quinasas activadas por mitógenos) forman parte de la cascada de señalización Ras/Raf/MAPK, que puede activarse por numerosos estímulos, incluyendo leptina.

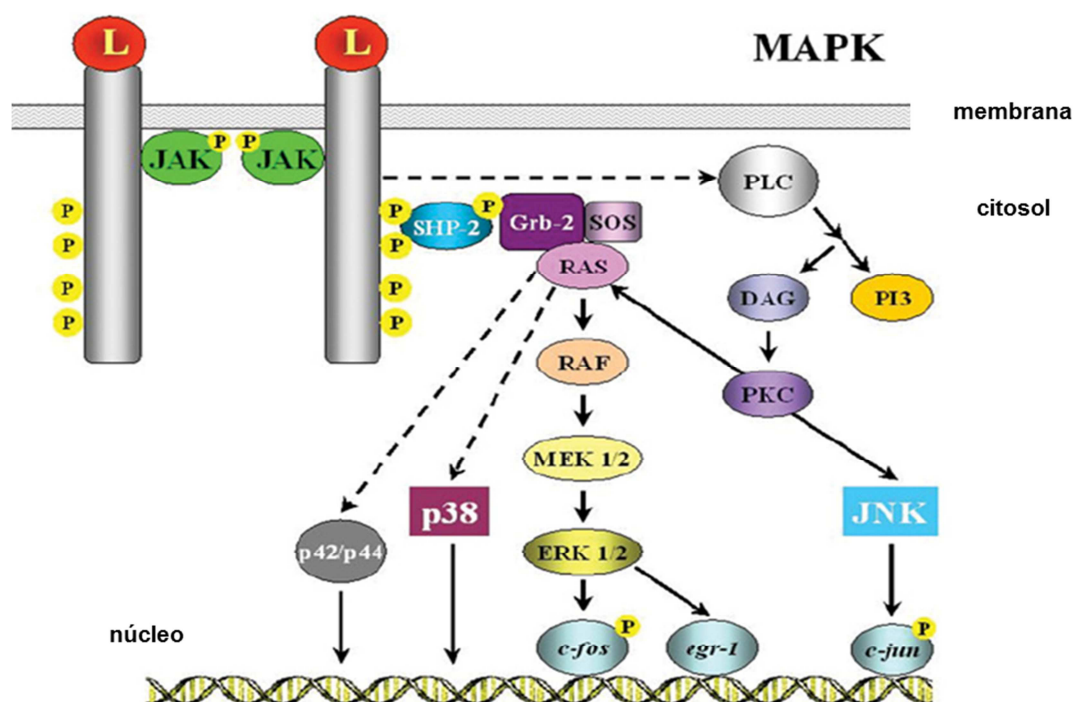


Figura 8. Activación de ERK1/2, p38 y JNK inducida por la unión de leptina a su receptor. (Modificado de Frühbeck G et al. 2006)

Las MAPK pueden activarse tanto por el receptor de leptina OB-Ra como OB-Rb [119, 127], pero la parte distal del receptor largo es necesaria para alcanzar la actividad máxima. La leptina puede activar la cascada de las MAPK a través de dos vías distintas, bien mediante la fosforilación en una tirosina de la región Jak2 asociada al receptor o bien de forma independiente de la fosforilación de Jak2 [17, 128]. En cualquiera de los dos casos, la señalización requiere un dominio catalítico intacto SHP-2 (tirosina fosfatasa) puesto que la ausencia de esta fosfatasa impide la correcta fosforilación de ERK por leptina [129].

1.5.2.1 VÍA DE ERK1/2

Aunque las moléculas implicadas en la señalización por leptina no han sido del todo elucidadas, se sabe que la activación de MEK (MAPK/ERK quinasas) conduce a la fosforilación de ERK que finalmente conduce a la expresión de sus genes diana como c-fos y egr-1 que participan en la proliferación y diferenciación celular.

La activación de la señalización por ERK inducida por leptina se ha observado tanto in vivo como in vitro, y a nivel central y periférico. A nivel cardíaco, la activación de ERK1/2 por leptina se ha relacionado los efectos cardioprotectores de leptina frente al daño por isquemia y reperfusión [82].

1.5.2.2 VÍA DE P38

Un gran número de estímulos, incluyendo el estrés osmótico, el shock térmico y algunas citoquinas, entre otros, puede activar otro miembro de la familia de las MAPK, la proteína p38 [28]. Entre estos estímulos se encuentra leptina. A nivel cardíaco, p38 se ha relacionado con una estimulación de la oxidación de ácidos grasos [130] y con la regulación de la síntesis y degradación de la matriz extracelular [131]. Asimismo, en células de músculo liso vascular, leptina induce hipertrofia a través de la vía de p38 [132].

1.5.3 VÍA DE PI3K/Akt/mTOR

La actividad de la PI3K se regula por un amplio espectro de ligandos, en particular por factores de crecimiento y hormonas como la insulina [133]. La PI3K se activa cuando se une por su subunidad reguladora a proteínas fosforiladas en residuos tirosina, que inducen un cambio conformacional que permite la activación de la subunidad catalítica. La función de la PI3K es añadir un grupo fosfato a la posición 3' del anillo de inositol en los fosfatidilinositol [133]. Los productos de esta quinasa activan otras proteínas quinasas como la Akt o proteína quinasa B (PKB) y en ocasiones también activan isoformas de la proteína quinasa C (PKC) [133].

La proteína quinasa B (PKB) o Akt es una serina/treonina quinasa que juega un papel fundamental en numerosos procesos celulares, incluyendo la supervivencia celular y el metabolismo de los hidratos de carbono [134]. La activación de Akt implica la unión de su dominio PH a fosfoinositoles D3-fosforilados y la consiguiente fosforilación de Akt en el residuo treonina 308 y serina 473 [134].

La capacidad de leptina de activar la Akt se observó por primera vez en células Fao tratadas con leptina durante 10 ó 15 minutos [135]. A nivel cardíaco, leptina es capaz de activar la Akt en los cardiomiocitos. Esta activación de Akt se ha relacionado con cardioprotección [82] y con la inducción de hipertrofia [93].

Una de las dianas de la Akt es la vía de mTOR, de sus siglas en inglés mammalian target of rapamycin, que es uno de los principales factores de transcripción implicados en el crecimiento celular [136, 137]. A nivel cardiaco, la vía de mTOR y su diana principal, la proteína p70S6K se han relacionado con la hipertrofia cardiaca. En un estudio realizado en cardiomiocitos neonatales de rata, se ha observado que la inhibición de la activación de la vía de mTOR inducida por leptina, previene los efectos hipertróficos que promueve esta hormona en cardiomiocitos neonatales [93].

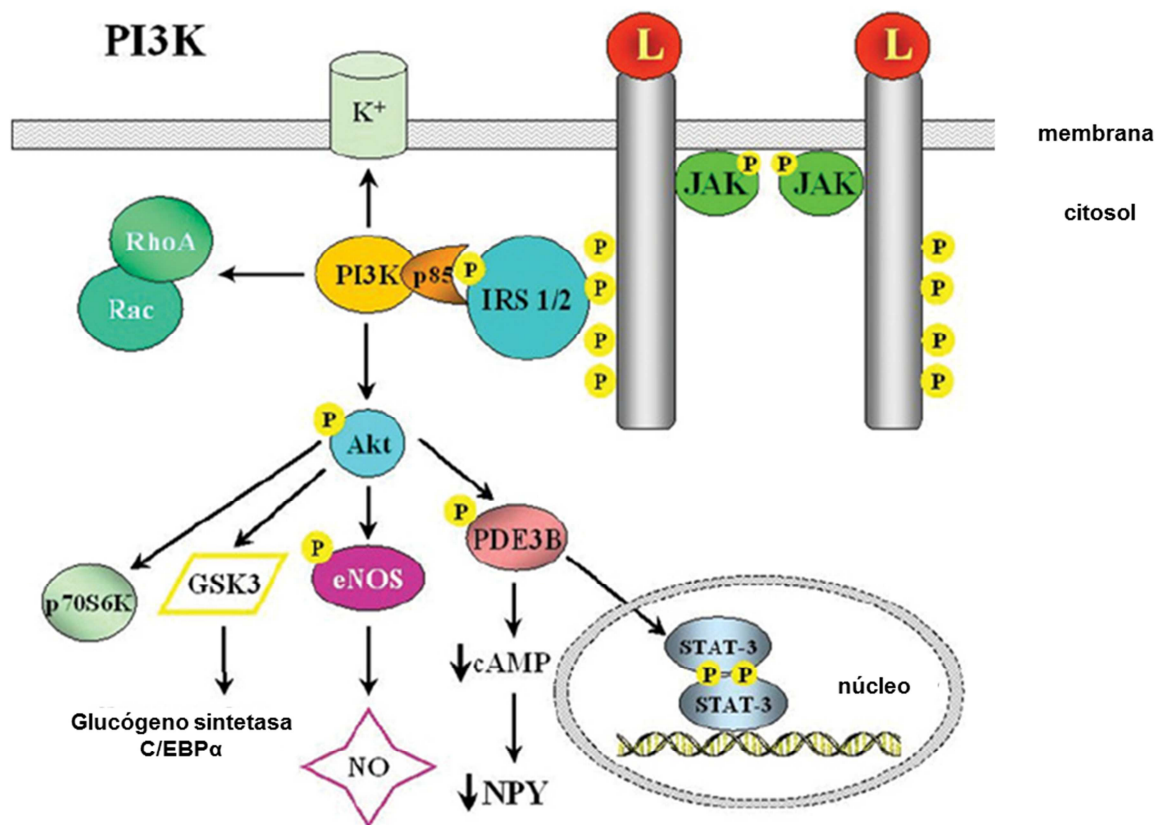


Figura 9. Activación de PI3K, Akt, mTOR inducida por la unión de leptina a su receptor. (Modificado de Frühbeck G et al. 2006)

1.5.4 VÍA DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC)

La familia de serina/treonina quinasas PKC se ha implicado en numerosos efectos celulares [138]. La leptina parece tener tanto efectos positivos como negativos en la estimulación de la PKC. En ratones ob/ob deficientes en leptina, la liberación de insulina por los islotes pancreáticos en respuesta a la activación de PKC se disminuye cuando a los ratones se les administra leptina de

forma exógena [139]. Sin embargo, en otros estudios se ha observado que leptina puede activar PKC en células epiteliales del colon [140].

1.5.5 VÍA DE AMPc / FOSFODIESTERASAS

El AMP cíclico activa proteína quinasas A y juega un papel muy importante en la relación entre varias vías de señalización [141, 142]. El metabolismo del AMP cíclico (AMPc) y el GMP cíclico (GMPc), está regulado por fosfodiesterasas [143]. La leptina es capaz de disminuir los niveles de AMPc en las células β pancreáticas a través de la activación de fosfodiesterasas 3B (PDE3B) [144]. Una consecuencia fisiológica importante de esta respuesta a leptina es una inhibición de la secreción de insulina inducida por glucosa [144].

1.5.6 VÍA DE Rho Y CITOESQUELETO DE ACTINA

La familia de GTPasas Rho está implicada en muchos procesos celulares como la apoptosis o la regulación del citoesqueleto de actina-miosina [145]. Como consecuencia, la activación de esta vía por leptina está relacionada con la señalización celular y la señalización célula-célula, así como en la adhesión de las células a la matriz extracelular y la migración de las células [146].

1.5.7 VÍA DEL NO

El NO interacciona con guanilato ciclasa soluble para evocar un gran número de respuestas fisiológicas [147]. La implicación del NO en funciones fisiológicas es aún mayor si se tiene en cuenta que el NO también interacciona con oxígeno molecular y radicales superóxido para producir especies reactivas de nitrógeno, que pueden modificar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [148].

Se han publicado distintos estudios que analizan los efectos de leptina en la producción de NO y la expresión de la óxido nítrico sintetasa (NOS) y sus implicaciones fisiológicas.

Varios estudios han confirmado que leptina induce un incremento en la producción de NO. La administración intravenosa de leptina a ratas Wistar incrementa las concentraciones séricas de NO hasta un 90%, un efecto que no se observa en las ratas Zucker fa/fa [149]. Además, leptina incrementa la producción de NO y de nitratos y nitritos por las células endoteliales [150] y de esta forma produce una relajación arterial [151]. Este efecto, se ve abolido por el tratamiento con L-

NAME. Por otro lado, leptina puede regular la contractilidad cardiaca mediante el incremento de la producción de NO en cardiomiocitos ventriculares de rata adulta [152].

Por tanto, existen evidencias claras de que leptina contribuye a la producción de NO. Esto podría tener numerosas consecuencias puesto que leptina también incrementa la actividad del sistema simpático en los tejidos periféricos y por tanto produce un incremento de la presión arterial [153]. Sin embargo, no parece que el NO liberado por leptina sea suficiente para oponerse al efecto vasoconstrictor inducido como consecuencia de la activación simpática [154].

Por otro lado, el L-NAME es capaz de inhibir el efecto de leptina sobre la captación de glucosa en el músculo esquelético, pero no en el tejido adiposo [155]. Tampoco bloquea el efecto de leptina en la estimulación de la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el hipotálamo de ratas [156]. Por tanto, el NO es un mediador de los efectos de leptina, pero no un mediador ubicuo de estos efectos.

La leptina es capaz de regular los niveles de NO mediante la regulación de la expresión de NOS. Sin embargo, se han observado efectos contradictorios del tratamiento con leptina en la expresión de NOS. La inyección intracerebroventricular o intraperitoneal de leptina durante 5 días disminuye la actividad nNOS en ratones [157]. También se ha observado una reducción en la expresión de la NOS tras la inyección subcutánea de leptina tanto en el hipotálamo como en el tejido adiposo marrón, aunque no se observaron cambios en el tejido adiposo blanco de ratones ob/ob [158]. Pero por otro lado, en otros tejidos se ha observado un incremento de los niveles de iNOS y eNOS inducidos por leptina [159].

1.5.8 OTRAS VÍAS

Existen otras proteínas de señalización reguladas por leptina. Se ha demostrado que leptina puede incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células endoteliales umbilicales humanas (HUVEC) o en células endoteliales aórticas bovinas (BAEC) [160, 161]. Estas especies reactivas de oxígeno parecen relevantes en la patogénesis de las complicaciones cardiovasculares asociadas a la obesidad, como la aterosclerosis. La leptina también estimula la producción de prostaglandina E2 y F2 α en células hipotalámicas de rata [156].

Además, activa a la fosfolipasa C y puede alterar canales de voltaje dependientes de calcio como el canal de calcio tipo L o el tipo N [162].

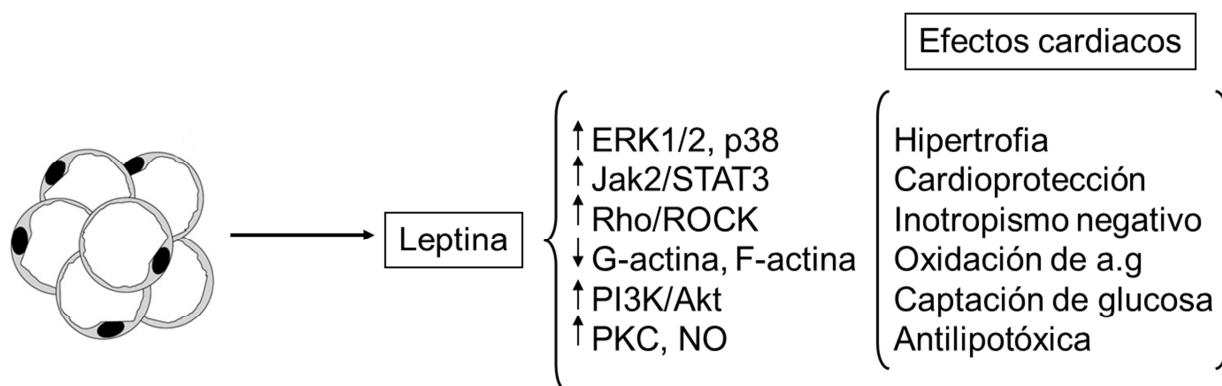


Figura 10. Vías de señalización activadas por leptina y sus efectos cardíacos

1.6 LEPTINA Y PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR

Hasta la fecha se han realizado un gran número de estudios que analizan la asociación entre los niveles circulantes de leptina y la enfermedad cardiovascular. Aunque estos estudios han arrojado resultados paradójicos, se podría decir que tanto los niveles elevados de leptina circulante que se observan en individuos obesos [163, 164] como la ausencia de leptina que ocurre en modelos genéticos de deficiencia de leptina, se correlacionan con peores pronósticos y con patologías como la hipertensión, la aterosclerosis, el ictus y el infarto de miocardio [165-167]. En consonancia con estos datos, recientemente se ha propuesto que los niveles de leptina circulantes se correlacionan de forma significativa con la insuficiencia cardíaca en ausencia de una enfermedad coronaria establecida [168]. Sin embargo, en individuos con una enfermedad coronaria previa, aunque la obesidad incrementa el riesgo de padecer insuficiencia cardíaca, este riesgo es independiente de los niveles de leptina [168]. Otros trabajos han propuesto que leptina puede ser un predictor de peores pronósticos en pacientes con enfermedad coronaria o insuficiencia cardíaca [169]. En un estudio en el que se analizaba tejido de corazones humanos con insuficiencia cardíaca, se observó un aumento en la expresión de leptina y de su receptor y la utilización de un dispositivo en el ventrículo para reducir la sobrecarga mecánica fue capaz de revertir parcialmente ese incremento [125]. Además, la

leptina administrada de forma exógena, puede producir hipertrofia cardiaca, tanto in vitro como in vivo [170].

Por otro lado, también existen estudios que han concluido que niveles muy bajos de leptina se asocian con un mayor número de eventos cardiovasculares y mortalidad en pacientes con enfermedad coronaria estable [171]. La leptina, además, es fundamental para que se produzcan los efectos beneficiosos de la restricción calórica en enfermedades como la esteatosis cardiaca, sugiriendo estos datos que la leptina tiene un efecto anti-lipotóxico a nivel cardiaco [172, 173].

Los ratones ob/ob deficientes en leptina, muestran una sensibilidad aumentada a la ligadura de la arteria coronaria, presentando una mortalidad más elevada. La hipertrofia cardiaca que presentan estos ratones es superior a la de los ratones controles, así como la disfunción ventricular. Estos efectos de la ligadura sobre los ratones ob/ob se revierten tras la administración de leptina de manera exógena a través de un mecanismo dependiente de STAT3, demostrando un efecto beneficioso de la leptina [174]. Además, en la isquemia aguda del miocardio, la leptina puede ejercer un efecto protector frente al daño por isquemia reperusión, probablemente a través de la vía de la fosfoinositol-3-kinasa/Akt y de la MAPK ERK1/2 [82].

A nivel celular, la leptina puede ejercer numerosos efectos pleiotrópicos en el miocardio, de tal forma que se ha implicado en el remodelado cardiaco a distintos niveles [175]. La leptina es capaz de activar vías proinflamatorias, así como de reclutar células implicadas en el proceso inflamatorio. Como consecuencia de la activación de estas vías, se puede producir una disfunción a nivel endotelial. Por otra parte, la leptina inhibe la apoptosis de los miocitos cardiacos en determinadas circunstancias y tiene efectos prohipertróficos o antihipertróficos en los cardiomiocitos en función del contexto celular y la concentración.

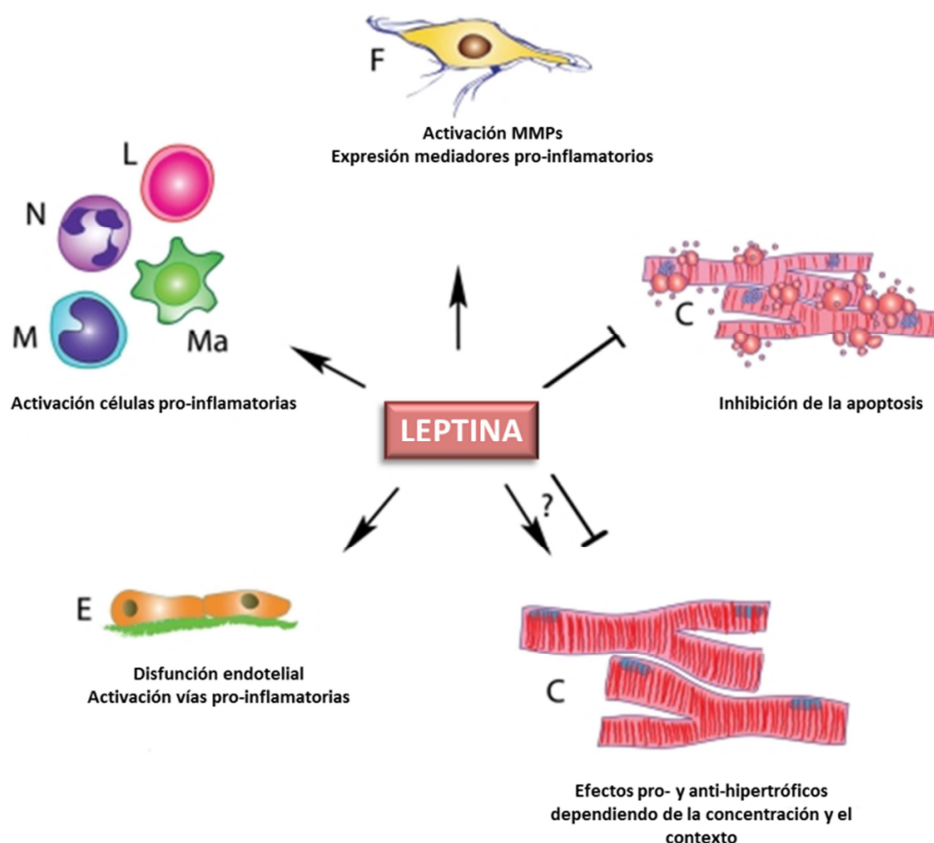


Figura 11. Efectos celulares de la leptina. (Modificado de Dobaczewski M. et al, 2011)

Los efectos de la leptina en el sistema cardiovascular son difíciles de resumir debido a la discrepancia de los datos, y además, hay que tener en cuenta factores como la edad, el grado de hiperleptinemia y la coexistencia de otras patologías. De hecho, en un trabajo reciente de Ren y colaboradores, han observado que existe una diferencia en la respuesta a la leptina asociada a la edad en ratones ob/ob. En su estudio, la repleción de leptina hasta niveles fisiológicos mejoró la disfunción en la contractilidad de los cardiomiocitos y redujo la acumulación de superóxido en ratones jóvenes, pero no produjo este efecto en ratones de más de 18 meses de edad [176].

El papel de la leptina en la respuesta al daño cardíaco depende, por tanto, de la naturaleza del daño y de otros factores como la especie animal, y la concentración o dosis de leptina administrada y la edad. Además, los efectos indirectos de la leptina pueden contribuir al efecto de la misma en el corazón. Por ejemplo, los efectos prohipertrofos de leptina se han asociado con la capacidad de la misma de producir hipertensión a través de la activación del sistema nervioso simpático [153] y con la relación de la leptina con la hipertensión asociada a la obesidad [177, 178]. De esta forma, hay

que considerar estos efectos indirectos como factores que pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad cardiovascular.

1.7 LEPTINA Y OBESIDAD

1.7.1 OBESIDAD

La tasa de obesidad se ha incrementado en los últimos años de forma alarmante, hasta el punto de convertirse en un problema de salud pública. Además de suponer un aumento de riesgo de padecer enfermedades como la hipertensión o la insuficiencia cardíaca, habitualmente los individuos obesos son estigmatizados por la sociedad. Por este motivo, cada vez se dedica mayor atención a intentar elucidar los componentes del sistema homeostático que regula el peso corporal y los genes responsables de algunos tipos de obesidad tanto en animales como en humanos. En este escenario, un factor clave es la hormona leptina, la principal reguladora de la ingesta y el peso corporal.

La obesidad es uno de los problemas más acuciantes del mundo desarrollado [179, 180]. Existen fundamentalmente dos puntos de vista que explican la obesidad humana. Uno de ellos sugiere que la obesidad se produce como consecuencia de una falta de disciplina por parte de los individuos afectados mientras que el otro sugiere que el peso corporal (o con más exactitud, la cantidad de grasa corporal) está controlada de forma fisiológica y que las variaciones en el peso en cualquier sentido activan una respuesta de resistencia a esas variaciones. Este último punto de vista implica la noción de que el peso corporal del individuo está determinado por factores biológicos [181].

La obesidad se define como un aumento significativo sobre el peso ideal, siendo definido el peso ideal como aquel que maximiza la esperanza de vida. Las tablas actuales indican que la esperanza de vida se reduce cuando el índice de masa corporal (IMC, definido como la masa en Kg dividida por el cuadrado de la altura en metros), se aumenta significativamente por encima del nivel ideal ($IMC > 25$) [180, 182, 183]. Esta definición clasifica como obesos al 20% de la población estadounidense y un porcentaje ligeramente más bajo de la población europea. En los últimos años, se ha producido, asimismo, un incremento alarmante de la obesidad en adolescentes [184], habiéndose asociado en esta población la obesidad con mayor morbilidad y convirtiéndose, por tanto, en un problema de salud pública.

Por razones que aún no se conocen en su totalidad, la obesidad se ha asociado con un incremento en el riesgo de padecer hipertensión, enfermedad cardiovascular, diabetes y cáncer [180] e incluso una pérdida de peso modesta mejora estas condiciones asociadas.

Con todos estos antecedentes, actualmente la pregunta crítica es ¿por qué, en las mismas condiciones ambientales, unos individuos son delgados y otros desarrollan obesidad? Entre otras respuestas a esta pregunta se encuentra la identificación de algunos genes responsables de la obesidad en modelos animales y en el humano.

1.7.2 RELACIÓN ENTRE LEPTINA Y OBESIDAD

En general, los llamados genes de la obesidad, codifican los componentes moleculares de un sistema homeostático encargado de regular el peso corporal. Un elemento fundamental de este sistema es leptina [40]. La leptina se produce principalmente por el tejido adiposo y regula la ingesta calórica en el hipotálamo. Una disminución en la grasa corporal conduce a un descenso de esta hormona, que finalmente estimula la ingesta calórica. Además, los niveles bajos de leptina activan la respuesta hormonal característica del estado de ayuno [185]. Por otro lado, un incremento en los niveles de grasa corporal se relacionan con niveles de leptina circulantes aumentados, que finalmente reducen la ingesta calórica. Mediante este mecanismo, el peso se mantiene en un rango relativamente estrecho. Por tanto, como sería lógico pensar, las mutaciones que resultan en una deficiencia de leptina se asocian con obesidad mórbida en humanos y en roedores [4, 186].

Sin embargo, en un gran porcentaje de casos, la respuesta a por qué unos individuos son obesos y otros no parece encontrarse en un fenómeno conocido como resistencia a leptina. La sensibilidad a esta hormona es variable y, en general, los individuos obesos son resistentes a leptina [186-188]. Además, un pequeño grupo de individuos obesos parece producir poca leptina. En principio, factores genéticos, ambientales e incluso psicológicos pueden influenciar la sensibilidad y la producción de leptina y en consecuencia afectar al peso corporal.

1.7.3 RESISTENCIA A LEPTINA

En estudios clínicos se ha observado que el subgrupo de pacientes con sobrepeso y obesidad que se sitúan en el rango más bajo de índice de masa corporal y aquellos que tienen los niveles más bajos de leptina, independientemente del peso corporal y del nivel de adiposidad, son los que presentan una mayor respuesta catabólica a leptina [189, 190]. Estas observaciones, junto con el hecho de que los pacientes obesos tienen unos niveles circulantes de leptina elevados [191, 192], han inspirado la noción de resistencia a leptina [193] en las formas comunes de obesidad, un concepto análogo a la resistencia a la insulina y que con frecuencia coexisten en individuos obesos.

En estudios en roedores, la resistencia a leptina se ha considerado una potencial causa de obesidad principalmente debido a su incapacidad para unirse a su receptor o a una disminución en las cascadas intracelulares activadas por el receptor OB [194].

El receptor de leptina, es un receptor de citoquinas de tipo 1. La unión con su ligando trae como consecuencia un cambio conformacional que activa la vía de JAK2-STAT [195]. Una vez activada, esta vía es capaz a su vez de activar varias moléculas de señalización intracelular. De esta forma, la detección de STAT-3 es un ensayo importante de la actividad del receptor de leptina *in vivo* [196]. Hasta la fecha se han descrito algunos procesos capaces de atenuar la señalización por leptina. La activación de STAT-3 por leptina es capaz de promover la transcripción y acumulación de SOCS3 (un inhibidor de la activación de la vía de STAT-3) y de esta forma, se establece un feedback negativo [127]. Otras fosfatasa como la protein-tirosina fosfatasa1B (PTP)1B median la defosforilación de JAK2, limitando así la duración de la actividad de leptina tanto en cultivos celulares como *in vivo* [197, 198]. Otras vías también limitan la acción de leptina en los tejidos periféricos, como el adiposo, el hígado y músculo. En estos tejidos, la obesidad aumenta el estrés del retículo sarcoplásmico y se produce un estado de inflamación crónica que contribuye a la resistencia a la insulina. Este proceso a su vez, puede participar en la atenuación de la señalización por leptina en la obesidad [199-201]. Por tanto, las moléculas SOCS3, PTP1B, el estrés del retículo sarcoplásmico y la inflamación, son algunos de los mecanismos moleculares y celulares que de forma directa atenúan la señalización por leptina en la obesidad y son mediadores de la resistencia a leptina.

Por otro lado, las alteraciones y mutaciones en el receptor de leptina son una de las causas de la disminución de la señalización por leptina [202] y que, por tanto, conducen a un estado de resistencia a leptina y son causa de obesidad. Sin embargo, estas mutaciones son poco frecuentes en humanos. En los casos en los que el tráfico del receptor o la señalización a través del mismo están comprometidos, también es fácil encontrar una relación entre estas alteraciones y la obesidad debido a que se establece una nuevamente una resistencia a leptina. Sin embargo, lo más frecuente es que la resistencia a leptina en humanos se deba a alteraciones en los circuitos neuronales regulados por leptina. Las bases moleculares para la resistencia a leptina debido a alteraciones a nivel central se han explicado en diversos estudios.

La leptina actúa en células nerviosas en el cerebro y modula su función. Algunas de las moléculas más importantes en esta regulación son el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con agouti (AgRP), que estimulan la ingesta de comida y la hormona estimulante de α -melanocitos (α -MSH) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART), que disminuyen la ingesta de comida [38, 203-205]. Existen evidencias genéticas de que leptina modula el balance energético mediante la regulación del balance entre los péptidos mencionados previamente [206]. Mutaciones en la proopiomelanocortina (POMC), el precursor de la α -MSH, se han asociado con la obesidad [207]. Entre el 3 y el 5% de los individuos extremadamente obesos, presentan mutaciones en un receptor de MSH (MC4R) que resulta en un defecto en la señalización de MSH, que causa resistencia a leptina [208-210]. En otros casos, se ha sugerido que defectos en el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica es la causa de la resistencia a leptina que ocurre en la obesidad [40, 211].

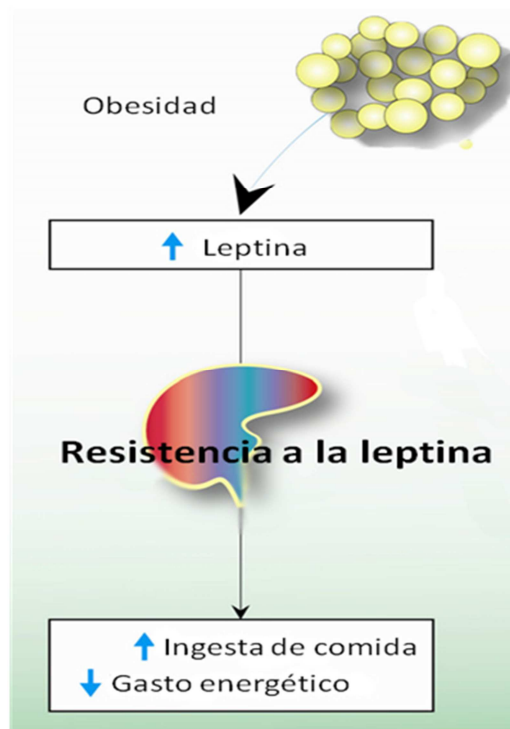


Figura 12. Principales consecuencias del desarrollo de resistencia a leptina. (Modificado de Ricci R. et al, 2012)

Aunque las alteraciones previamente mencionadas en humanos y animales han proporcionado un gran avance en el conocimiento de los mecanismos relacionados con la obesidad mórbida y los sistemas que gobiernan el balance energético, parece que cambios ambientales, independientes de alteraciones genéticas, son la principal causa de la epidemia de obesidad que se ha producido en los países desarrollados y en vías de desarrollo. En los últimos 50 años, el balance energético se ha desequilibrado debido a dos factores fundamentales: un descenso en el gasto energético debido a una disminución de la actividad física y un incremento en la disponibilidad y abundancia de comidas apetecibles y altamente calóricas.

En este contexto, se desconoce si la resistencia a leptina es una causa o un efecto del desarrollo de la obesidad. Una explicación que tiene en cuenta todos estos factores es la sugerida por Martin G. Myers JR y colaboradores: un incremento en la ingesta se asocia con un incremento en la adiposidad, que a su vez produce un incremento en la resistencia celular a leptina que sería la responsable de que la señalización a través del receptor OB no alcance los niveles adecuados promoviendo un aumento del peso corporal [212].

Un aspecto importante a tener en cuenta en la resistencia a leptina es el concepto de resistencia selectiva a leptina [163, 165, 213]. Este concepto propone que alguno de los efectos mediados por leptina, como por ejemplo la supresión del apetito, se pueden ver atenuados, mientras que otros como el remodelado cardíaco o el tono simpático permanecen intactos. Existen estudios recientes que apoyan este concepto. En un estudio en el que se usaron animales con una obesidad inducida por la dieta, los ratones desarrollaron resistencia a los efectos metabólicos de la leptina, pero no a la activación simpática mediada por leptina [214]. El fenómeno de resistencia selectiva a leptina también se ha observado en modelos de conejo sometidos a dieta grasa [215]. Asimismo, trabajos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que en modelos de obesidad inducida por dieta en ratón, la resistencia a leptina se desarrolla de forma específica en distintos tejidos y que el corazón parece preservar intacta la capacidad de respuesta a leptina [216, 217].

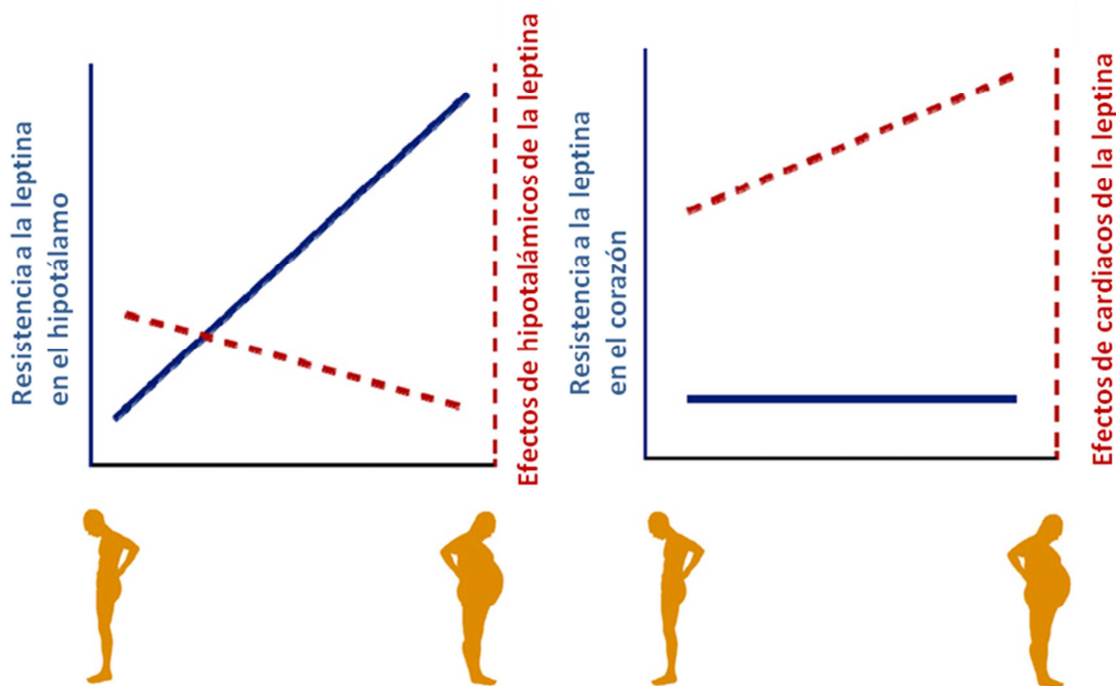


Figura 13. Resistencia selectiva a leptina. (Modificado de Abel ED. et al, 2012)

1.8 OBESIDAD Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Los niveles de leptina circulantes elevados que se observan durante la obesidad, se han relacionado con enfermedad cardiovascular [163, 218]. En un estudio multifactorial, la leptina se ha descrito como un predictor independiente de enfermedad cardiovascular [219].

Sin embargo, la relación entre obesidad y enfermedad cardiovascular es complicada. Algunos investigadores han sugerido que la conexión es indirecta y dependiente de la prevalencia de diabetes, hipertensión y dislipidemia, mientras que otros han demostrado una asociación independiente entre obesidad (especialmente obesidad abdominal) y riesgo cardiovascular [220, 221]. La relación entre obesidad y riesgo cardiovascular parece desarrollarse a una edad relativamente temprana, por ejemplo, la obesidad en hombres jóvenes, de entre 15 y 34 años, se asocia con una aterosclerosis de las coronarias acelerada [222]. Ya en 1956, Vague observó que la obesidad androide (obesidad del tren superior o abdominal) está más relacionada con la diabetes mellitus y la enfermedad coronaria que la obesidad ginoide (obesidad del tren inferior u obesidad gluteal y femoral) [223]. Posteriormente, numerosos estudios han confirmado el hecho de que la obesidad del tren superior es un mejor predictor de enfermedad cardiovascular [221, 224].

A nivel metabólico, la obesidad se relaciona directamente con resistencia a la insulina y con un incremento en la incidencia de síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 [225, 226]. La obesidad conduce a resistencia a la insulina por varios mecanismos, con frecuencia interrelacionados. En primer lugar, la señalización de la insulina y la homeostasis de la glucosa se encuentran alteradas por la existencia de depósitos de grasa intracelulares [227]. La infiltración de grasa en los islotes pancreáticos acelera la disminución de islotes asociada a la edad y su capacidad para mantener el incremento en la producción de insulina demandado por la resistencia a la insulina se ve mermada, de esta forma, se desarrolla una intolerancia a la glucosa prematura y se desarrolla rápidamente una diabetes mellitus tipo 2 [228]. Además, las adipquinas derivadas del tejido adiposo parecen estar implicadas en la regulación de la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos. La resistencia a la insulina asociada a la obesidad se considera el primer paso del desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. La mayor parte de los pacientes con esta enfermedad presentan sobrepeso. Aproximadamente un 90% de los individuos que desarrollan diabetes tipo 2 tienen un índice de masa corporal por encima de 23.0 kg/m² [229, 230].

La obesidad y la resistencia a la insulina también se han relacionado con alteraciones cualitativas y cuantitativas en los lípidos plasmáticos. La obesidad se caracteriza por una disminución en la captación de ácidos grasos por los adipocitos y una lipólisis excesiva [231]. Esas alteraciones conducen a unos niveles circulantes de ácidos grasos no esterificados elevados que finalmente resultan en una lipogénesis hepática incrementada. Este aumento de la capacidad secretora del hígado conduce a una esteatosis hepática [232] y a una desregulación de los niveles de VLDL, HDL y triglicéridos. La dislipidemia aterogénica se presenta con elevados niveles plasmáticos de triglicéridos, niveles incrementados de sdLDL y niveles disminuidos de HDL [231]. De hecho, existen evidencias de que en sujetos con IMC por encima de 25 kg/m² se desarrolla de forma progresiva este tipo de dislipidemia, resultando en un incremento de riesgo cardiovascular [229].

El desarrollo de aterosclerosis en la obesidad es consecuencia de la activación de varios mecanismos proaterogénicos interrelacionados. Se sabe que un IMC elevado se asocia con un estado de inflamación subclínico [233] y un aumento del estrés oxidativo sistémico [234]. Por otro lado, tanto la resistencia a la insulina como la hiperinsulinemia pueden conducir a una disfunción endotelial *per se*, debido a que en individuos resistentes a la insulina, la liberación de NO dependiente de insulina se encuentra dañada [235]. Niveles circulantes muy elevados de ácidos grasos no esterificados también pueden reducir la biodisponibilidad del NO y la vasodilatación dependiente de potasio [236]. La insulina, además, tiene efectos proliferativos sobre las células de músculo liso vasculares y puede incrementar la actividad de las metaloproteinasas, promoviendo así la degradación de la matriz extracelular y la ruptura de la placa de ateroma [237]. La expresión alterada de las adipoquinas que ocurre en la obesidad es un factor adicional responsable del círculo vicioso perpetuo que existe entre la inflamación y la disfunción endotelial. La leptina puede estimular la captación de colesterol por los macrófagos dando lugar a células espumosas que dan lugar al desarrollo de lesiones aterogénicas.

En conclusión, la obesidad da lugar a hiperinsulinemia, hiperglicemia, un incremento de los niveles circulantes de ácidos grasos no esterificados y mediadores proinflamatorios que en conjunto dan lugar a estrés oxidativo, inflamación y disfunción endotelial y favorecen el desarrollo de aterosclerosis.

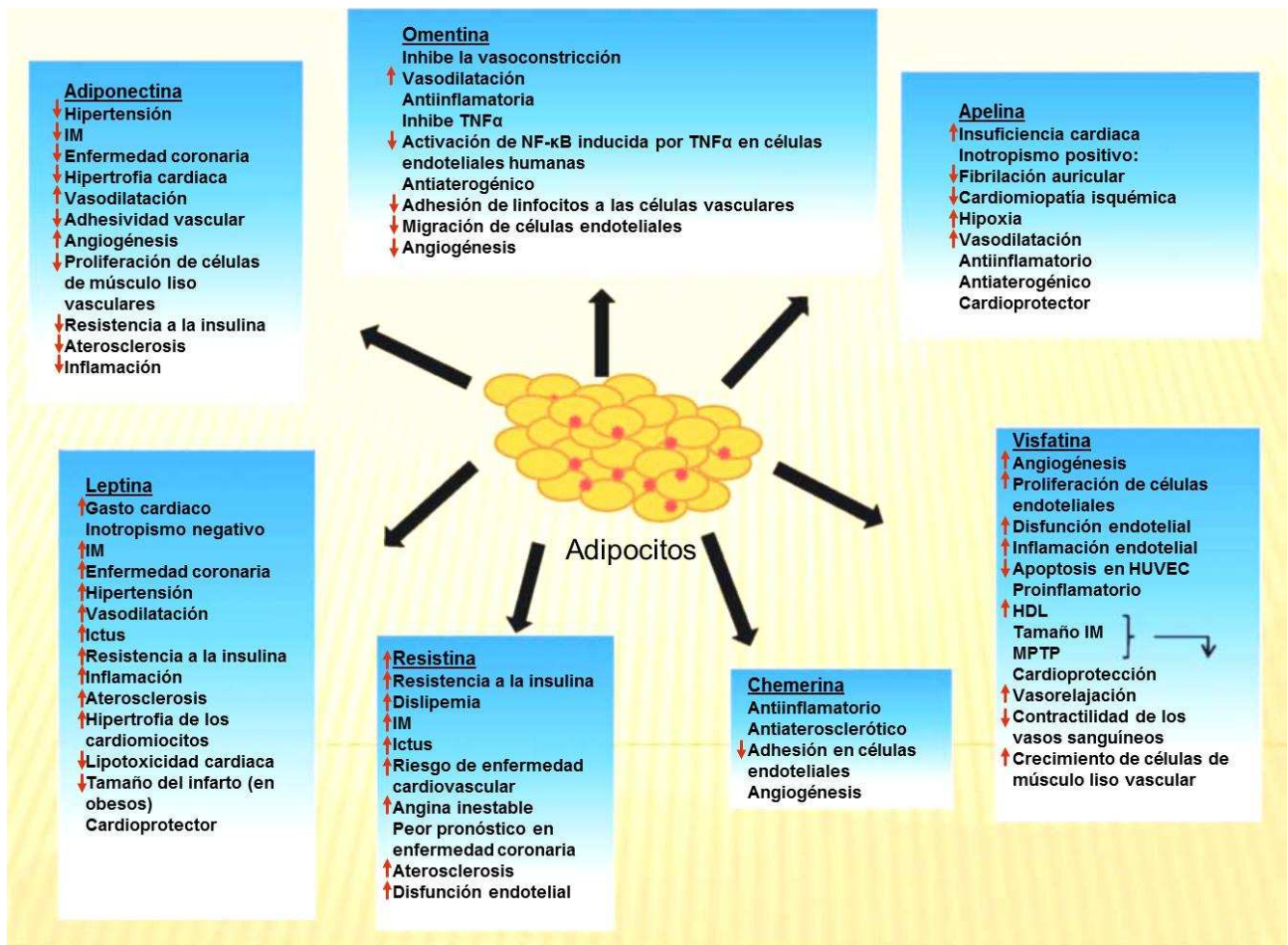


Figura 14. Efectos cardiovasculares de las distintas adipocitoquinas liberadas por los adipocitos.
(Modificado de Mattu H. et al, 2013)

La obesidad, asimismo, tiene numerosos efectos adversos en la hemodinámica y la estructura cardiovascular [238]. Incrementa el volumen total de sangre y el gasto cardíaco, y la sobrecarga del corazón es mucho mayor en pacientes obesos. Frecuentemente, estos pacientes tienen un mayor gasto cardíaco pero un nivel más bajo de las resistencias periféricas independientemente de la presión arterial [238, 239]. En la obesidad, la mayor parte del aumento en el gasto cardíaco se debe a las variaciones en el volumen de eyección, aunque al estar aumentada la actividad simpática, la frecuencia cardíaca también se encuentra aumentada [240]. Este aumento en la presión y volumen de llenado conduce en individuos con sobrepeso y obesidad a una mayor propensión a desarrollar dilatación del ventrículo izquierdo [238, 240, 241]. De esta forma, incluso independientemente de la presión arterial y de la edad, la obesidad incrementa el riesgo de desarrollar hipertrofia del

ventrículo izquierdo, así como de desarrollar otras anomalías estructurales incluyendo remodelado concéntrico e hipertrofia concéntrica del ventrículo izquierdo [242].

Por otro lado, la obesidad también predispone a un aumento del tamaño de la aurícula izquierda debido al incremento del volumen de sangre circulante y a un llenado anormal del ventrículo izquierdo [238, 243]. Estas alteraciones no solo incrementan el riesgo de insuficiencia cardiaca sino que también incrementan el riesgo de fibrilación auricular y otras comorbilidades [244].

Además, la obesidad aumenta la propensión a padecer arritmias ventriculares más frecuentes y más complejas [240] y tiene efectos adversos en la función sistólica y diastólica [238, 243, 245-247].

EFFECTOS ADVERSOS DE LA OBESIDAD	
A. Incremento de la resistencia a la insulina	
1)	Intolerancia a la glucosa
2)	Síndrome metabólico
3)	Diabetes mellitus tipo 2
B. Hipertensión	
C. Dislipidemia	
1)	Colesterol total elevado
2)	Triglicéridos elevados
3)	Colesterol LDL elevado
4)	Colesterol no-HDL elevado
5)	Apolipoproteína B elevada
6)	HDL disminuido
7)	Apolipoproteína A1 disminuida
D. Anomalías en la Geometría del ventrículo izquierdo	
1)	Remodelado concéntrico
2)	Hipertrofia del ventrículo izquierdo
E. Disfunción endotelial	
F. Inflamación sistémica y estado protrombótico	
G. Disfunción sistólica y diastólica	
H. Insuficiencia cardiaca	
I. Enfermedad coronaria	
J. Fibrilación auricular	
K. Apnea del sueño obstructiva	
L. Albuminuria	
M. Osteoartritis	
N. Cáncer	

Tabla 2. Efectos adversos de la obesidad. (Modificado de Lavie CJ. et al, 2009)

En este escenario, cada vez parece más claro que la obesidad (IMC >25) se asocia con una función cardíaca alterada. En un estudio de seguimiento a lo largo de 14 años con 5881 participantes del Estudio Framingham [65] se observó un incremento gradual en el riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca según aumentaba el IMC. Sin embargo, es importante resaltar que en pacientes con insuficiencia cardíaca, un IMC elevado no es un factor de riesgo para un peor pronóstico [248].

Esta discrepancia entre el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular asociado a la obesidad y el mejor pronóstico de la enfermedad en pacientes obesos ha conducido a la teoría de la paradoja de la obesidad.

1.9 PARADOJA DE LA OBESIDAD

Numerosos estudios señalan la obesidad como factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, sin embargo, otros estudios señalan que en individuos con una patología cardiovascular existente, el sobrepeso y la obesidad se correlacionan con un mejor pronóstico de la enfermedad. Este fenómeno se conoce como paradoja de la obesidad.

A pesar de que la prevalencia de hipertensión arterial es mayor en pacientes obesos, existen evidencias recientes de una paradoja de la obesidad. Uretsky y colaboradores [249] han analizado los parámetros cardiovasculares de 22576 pacientes hipertensos tratados y que presentaban enfermedad coronaria. Durante el seguimiento de dos años, la mortalidad por cualquier causa fue un 30% más baja en los pacientes obesos y con sobrepeso, a pesar de que el control de la hipertensión fue menos efectivo en estos pacientes que en los pacientes normopeso. Un estudio previo también había mostrado un menor riesgo de padecer un ictus y de mortalidad total entre los pacientes con sobrepeso comparados con los pacientes con un peso normal [250]. Otros trabajos realizados con pacientes hipertensos han mostrado una relación en forma de U entre la mortalidad por todas las causas, mortalidad por accidente cardiovascular y mortalidad por causas no relacionadas con un accidente cardiovascular y el IMC, encontrándose la mayor mortalidad en los dos extremos de IMC [251].

En otro ensayo con 800 pacientes de edad avanzada, se observó que la mortalidad total y la ocurrencia de accidentes cardiovasculares y no cardiovasculares mayores eran más elevadas entre los que presentaban un menor IMC [252]. La asociación entre IMC y eventos cardiovasculares

presentó una forma de U, mientras que la mortalidad no relacionada con accidentes cardiovasculares descendía con el aumento de IMC.

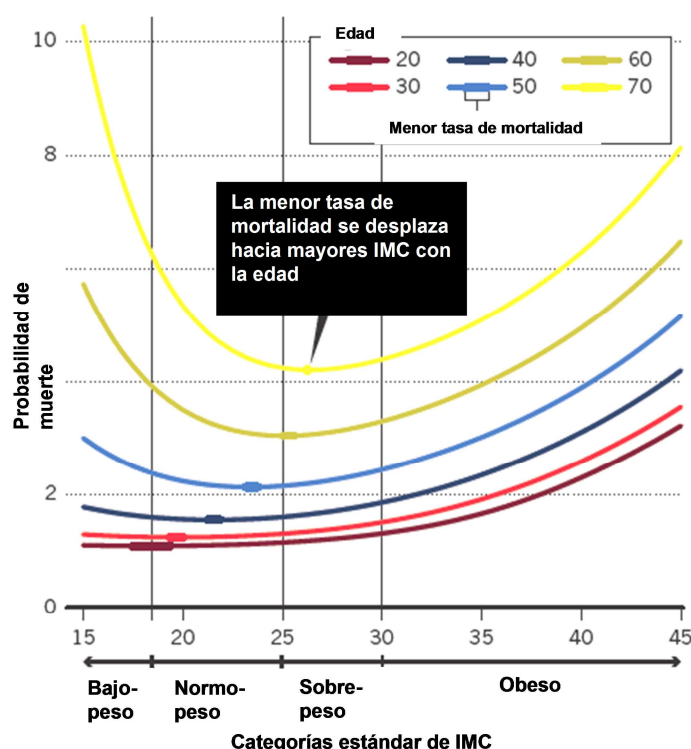


Figura 15. Tasas de mortalidad por todas las causas en función del índice de masa corporal. (Modificado de Hughes V. et al, 2013)

En conjunto, estos estudios sugieren que, aunque la obesidad puede ser un potente factor de riesgo para hipertensión arterial e hipertrofia ventricular izquierda, los pacientes obesos hipertensos pueden tener, de forma paradójica, mejor pronóstico, posiblemente debido a una menor resistencia vascular y menor actividad de la renina plasmática comparado con los pacientes hipertensos más delgados [253].

En otro trabajo realizado con 5881 participantes del estudio Framingham, Kenchaiah y colaboradores [65] mostraron que durante un seguimiento de 14 años, por cada aumento de 1 kg/m² en el IMC, el riesgo de padecer insuficiencia cardiaca aumentaba en un 5% en hombres y 7% en mujeres. De hecho, se observó un incremento gradual del riesgo de padecer insuficiencia cardiaca al aumentar de categoría de IMC. En un ensayo con 74 pacientes obesos mórbidos, casi un tercio de ellos presentó evidencias clínicas de insuficiencia cardiaca, y la probabilidad de padecerla

aumentaba con la duración de esa obesidad mórbida [247]. Pero a pesar de conocerse los efectos adversos de la obesidad en la función sistólica y diastólica del corazón, y de los datos epidemiológicos que muestran una relación entre obesidad, generalmente definida en términos de IMC e insuficiencia cardiaca, hay numerosos estudios que han sugerido que los pacientes obesos con insuficiencia cardiaca presentan un mejor pronóstico [254].

En un metanálisis de 9 estudios observacionales de pacientes con insuficiencia cardiaca (n=28209) en el que se realizó un seguimiento de 2,7 años, Oreopoulos y colaboradores [255] mostraron que comparados con individuos sin IMC elevado, los pacientes con sobrepeso y obesidad, presentaron una disminución en la mortalidad cardiovascular (-19% y -40% respectivamente) y en la mortalidad por cualquier causa (-16% y -33% respectivamente). De la misma forma, un análisis del IMC y la mortalidad en hospital de 108927 pacientes con insuficiencia cardiaca descompensada, mostró también una asociación entre mayores valores de IMC y menor mortalidad [256]. De hecho, por cada incremento de 5 unidades en el IMC, el riesgo de mortalidad fue un 10% menor ($P<0.001$).

Aunque estos investigadores han planteado la posibilidad de que sesgos en la selección de pacientes y diferencias en las características de partida entre los grupos hayan afectado sus resultados, también sugieren que un IMC elevado podría conferir algunos efectos protectores frente a la mortalidad por insuficiencia cardiaca [257].

Para explicar estos hechos se ha sugerido que, puesto que la insuficiencia cardiaca es un estado catabólico, los pacientes obesos podrían tener mayores reservas metabólicas [258-260]. Además, el perfil de citoquinas y hormonas de estos pacientes también puede ser protector [255]. El tejido adiposo produce receptores de TNF- α solubles que pueden jugar un papel protector en individuos obesos con insuficiencia cardiaca aguda o crónica al neutralizar los efectos biológicos adversos del TNF- α [261]. Por otro lado, los pacientes obesos o con sobrepeso presentan niveles circulantes menores de ANF [262] y pueden tener una actividad simpática reducida, así como menor respuesta al sistema renina angiotensina [255].

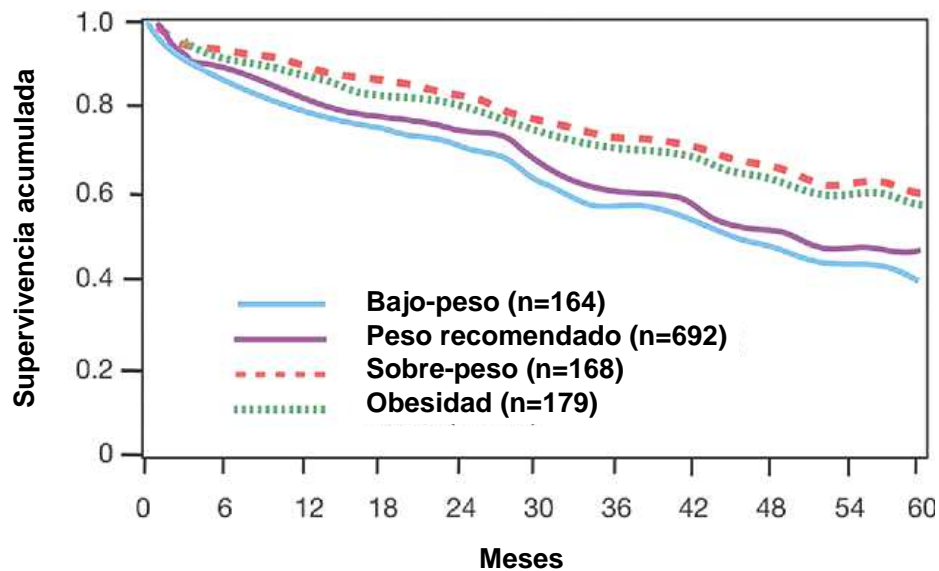


Figura 16. Supervivencia acumulada en función del peso en pacientes con insuficiencia cardíaca. (Modificado de Horwich TB. et al, 2001)

Estudios preliminares de Lavie y colaboradores muestran que también existe una influencia de la cantidad de grasa corporal en la supervivencia total.

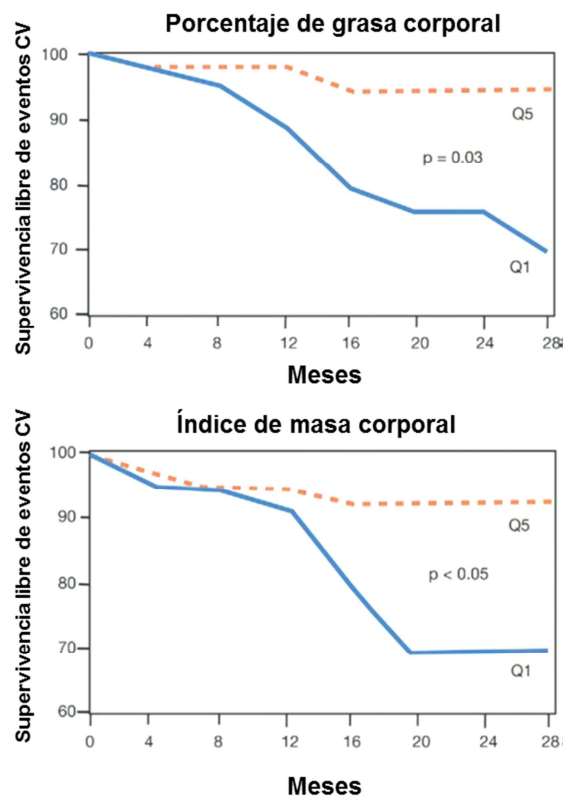


Figura 17. Supervivencia acumulada en función del porcentaje de grasa corporal y del índice de masa corporal en pacientes con insuficiencia cardíaca. (Modificado de Lavie. et al, 2009)

En pacientes con enfermedad coronaria, la obesidad juega un papel fundamental puesto que aumenta los factores de riesgo más importantes de enfermedad coronaria como la hipertensión arterial, la dislipidemia y la diabetes mellitus [253, 263-265].

Sin embargo, igual que en el caso de la hipertensión arterial y la insuficiencia cardíaca, hay estudios que han demostrado la existencia de una paradoja de la obesidad en enfermedad coronaria [263, 266]. En una revisión reciente de más de 250000 pacientes de 40 estudios de cohortes en los que se realizó un seguimiento durante 3.8 años, Romero-Corral y colaboradores [266] han observado que los pacientes obesos con enfermedad coronaria tienen menor riesgo de muerte por cualquier causa así como menor riesgo de mortalidad por accidente cardiovascular en comparación con los pacientes normopeso. Sin embargo, en pacientes con IMC por encima de 35 kg/m², se ha observado un mayor riesgo de mortalidad cardiovascular sin observarse incremento de la mortalidad total.

Aunque se desconoce el mecanismo por el que se produce este efecto, en conjunto los datos de nuevo sugieren que a pesar del hecho de que la obesidad es un factor de riesgo para desarrollar enfermedad coronaria, los pacientes con sobrepeso y obesidad media presentan mejor pronóstico que los pacientes normopeso cuando existe una enfermedad coronaria establecida.

La paradoja de la obesidad se ha observado también en pacientes post-infarto de miocardio y más recientemente en pacientes sometidos a test de ejercicio [266, 267].

Existen por tanto gran cantidad de evidencias que apoyan la importancia de la obesidad en la patogénesis y la progresión de enfermedad cardiovascular y aunque la paradoja de la obesidad existe, también existen evidencias claras de que la reducción de peso es clave para la prevención y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Por tanto, es necesario profundizar en estos mecanismos.

HIPERTROFIA E INSUFICIENCIA CARDIACA

2. HIPERTROFIA E INSUFICIENCIA CARDIACA

2.1 HIPERTROFIA CARDIACA

El corazón de los mamíferos es un músculo cuya principal función es bombear la sangre a través del sistema circulatorio para transportar el oxígeno y los nutrientes a los órganos y el dióxido de carbono de vuelta a los pulmones. En respuesta a una sobrecarga, causada por estimulación fisiológica o patológica, el corazón se hace más grande en un proceso conocido como hipertrofia (del griego aumento del tamaño), en el cual se disminuye el estrés sobre la pared del ventrículo y se mantiene o aumenta la función de bomba.

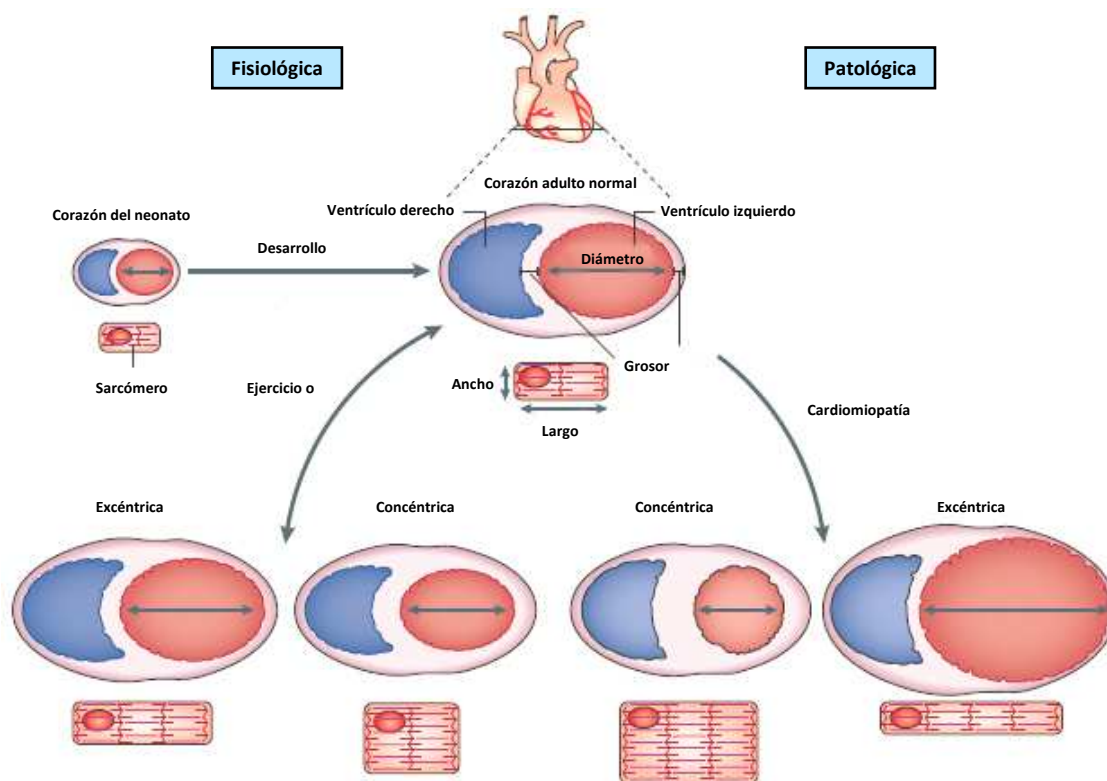


Figura 18. Diferencias morfológicas entre la hipertrofia fisiológica y patológica y concéntrica y excéntrica. (Modificado de Maillet M. et al, 2013)

Sin embargo, la hipertrofia es un fenómeno más complejo de lo que sugiere esta definición. Los cardiomiocitos, las células contráctiles del miocardio, a diferencia de otros tipos celulares existentes en el corazón (células endoteliales, fibroblastos, células inmunes y progenitoras), se diferencian de

forma terminal poco después del nacimiento y la mayoría de ellos pierden su capacidad para proliferar, aunque existe un pequeño reemplazo de cardiomiocitos a lo largo de la vida [268-270].

Como consecuencia, aunque la masa del corazón puede aumentar debido a la proliferación de los fibroblastos, y posiblemente debido a la actividad de los progenitores celulares y la renovación de algunos cardiomiocitos, el incremento de la masa principalmente ocurre debido a la hipertrofia de los cardiomiocitos. La hipertrofia cardiaca, ocurre frecuentemente como respuesta a estímulos patológicos como la hipertensión, el infarto de miocardio y la enfermedad coronaria, que conducen a un aumento del remodelado ventricular y dilatación, fibrosis y una disminución del gasto cardiaco [271, 272]. Sin embargo, el miocardio también puede hipertrofiarse en respuesta un estímulo fisiológico en un proceso adaptativo conocido como hipertrofia fisiológica, que fundamentalmente difiere de la hipertrofia patológica porque el corazón no desarrolla enfermedad e incluso se beneficia de este proceso [273].

2.1.1 HIPERTROFIA CARDIACA A NIVEL CELULAR

El corazón está compuesto de miocitos cardiacos o cardiomiocitos (células musculares) y otras células como: los fibroblastos, las células endoteliales, mastocitos y células de músculo liso vascular. Además, todas estas células se encuentran embebidas en la matriz extracelular [274, 275].

Los cardiomiocitos ventriculares solo son una tercera parte del total de las células cardiacas, pero suponen entre el 70 y el 80% de su masa [275-277].

En mamíferos, justo tras el nacimiento, la mayor parte de los cardiomiocitos pierden su capacidad de proliferación, por ello, el aumento del tamaño del corazón ocurre principalmente debido a un incremento en el tamaño de los miocitos [278].

Los miocitos se componen de paquetes de miofibrillas. Las miofibrillas contienen miofilamentos, que a su vez están compuestos de sarcómeros, la unidad contráctil básica del corazón. En el corazón se disponen con una orientación circunferencial y en espiral alrededor del ventrículo izquierdo, y tienen que contraerse de forma simultánea para asegurar la correcta función del corazón. Para ello, unos discos intercalados en los extremos de los cardiomiocitos mantienen la adhesión célula-célula y permiten que la fuerza contráctil se transmita de una célula a otra [279].

La hipertrofia del cardiomiocito, es la respuesta celular a los estímulos patológicos o fisiológicos previamente mencionados y suele ir precedida de una reinducción del llamado programa génico fetal [280]. Su crecimiento depende de la activación de varias vías de señalización, cambios en la expresión génica, aumento en la síntesis de determinadas proteínas y una reorganización de las proteínas contráctiles. Para que estos procesos se pongan en marcha, los miocitos presentan mecanismos intrínsecos de detección de alteraciones mecánicas como canales iónicos sensibles a la extensión. Asimismo, las integrinas parecen jugar un papel fundamental en la interacción de la matriz extracelular, el citoesqueleto, los sarcómeros, las proteínas implicadas en la regulación del calcio intracelular y el núcleo.

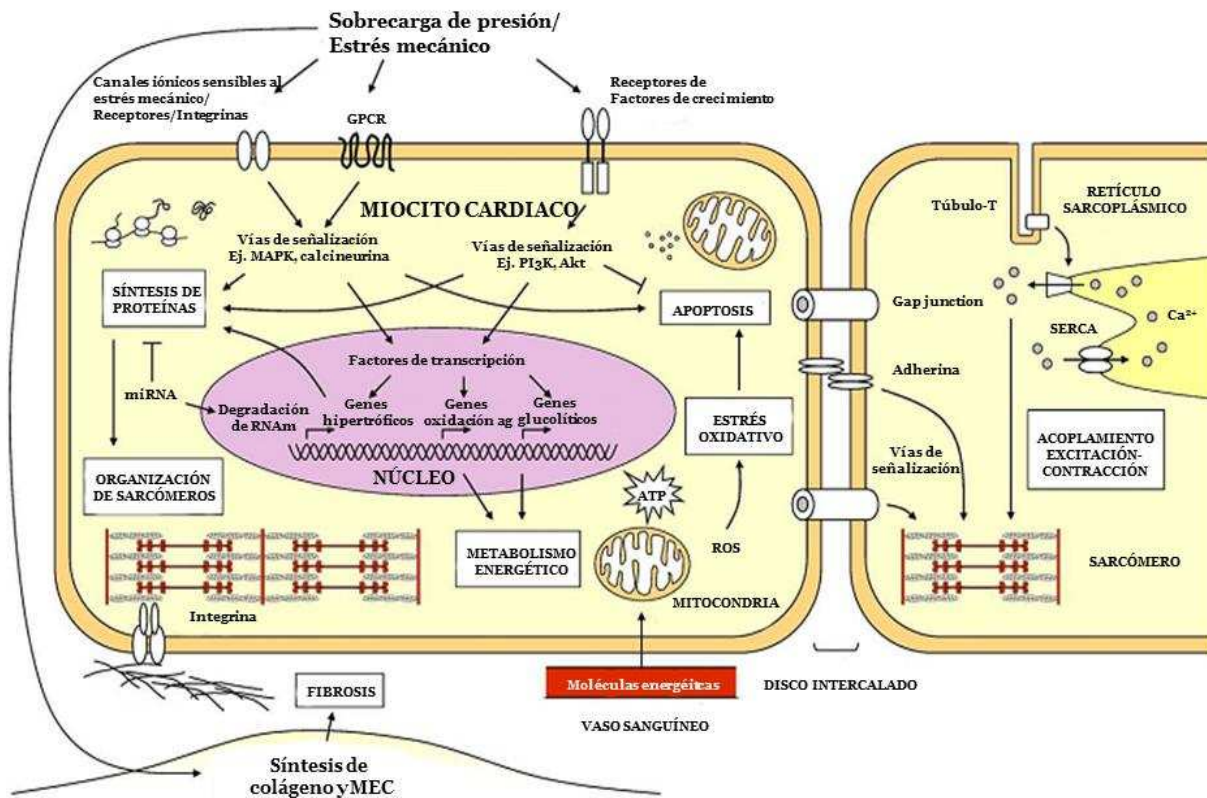


Figura 19. Vías de señalización activadas en la hipertrofia. (Modificado de Bernardo BC. et al, 2010)

2.1.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA HIPERTROFIA CARDIACA

2.1.2.1 CALCINEURINA- NFAT

La serina-treonina fosfatasa calcineurina (Cn) se expresa en múltiples tejidos y está formada por una subunidad catalítica A y una subunidad reguladora B. La calcineurina B está codificada por un único gen, mientras que se han descrito tres subunidades de calcineurina A diferentes (CnA α , CnA β y CnA γ) en vertebrados. La función fisiológica de la calcineurina se describió inicialmente en células T, en las que elevaciones en las concentraciones de calcio citosólicas promueven la asociación de la calmodulina con la calcineurina y la consecuente activación de la enzima [281]. La calcineurina defosforila factores de transcripción nucleares de la familia de los NFAT, de sus siglas en inglés Nuclear Factor of Activated T-cells, desenmascarando las señales de localización en el núcleo y resultando finalmente en una translocación de NFAT al núcleo y en la activación de genes relacionados con la respuesta inmune como la interleuquina-2 [282]. Se ha observado que esta vía de señalización también se activa en cardiomiocitos y que una activación constitutiva de la calcineurina en cardiomiocitos de ratón transgénico es suficiente para inducir un aumento del tamaño de los mismos e incluso una insuficiencia cardíaca [283]. Una respuesta similar, aunque menos dramática se obtiene sobreexpresando el factor nuclear NFAT3 de forma constitutiva, sugiriendo estos datos que el NFAT es una de las principales dianas de la vía de la calcineurina en cardiomiocitos. Pero, aunque estos estudios han mostrado que la activación de la vía de calcineurina/NFAT es suficiente para el desarrollo de hipertrofia cardíaca, si la activación de la calcineurina es necesaria o no en este proceso no parece tan claro.

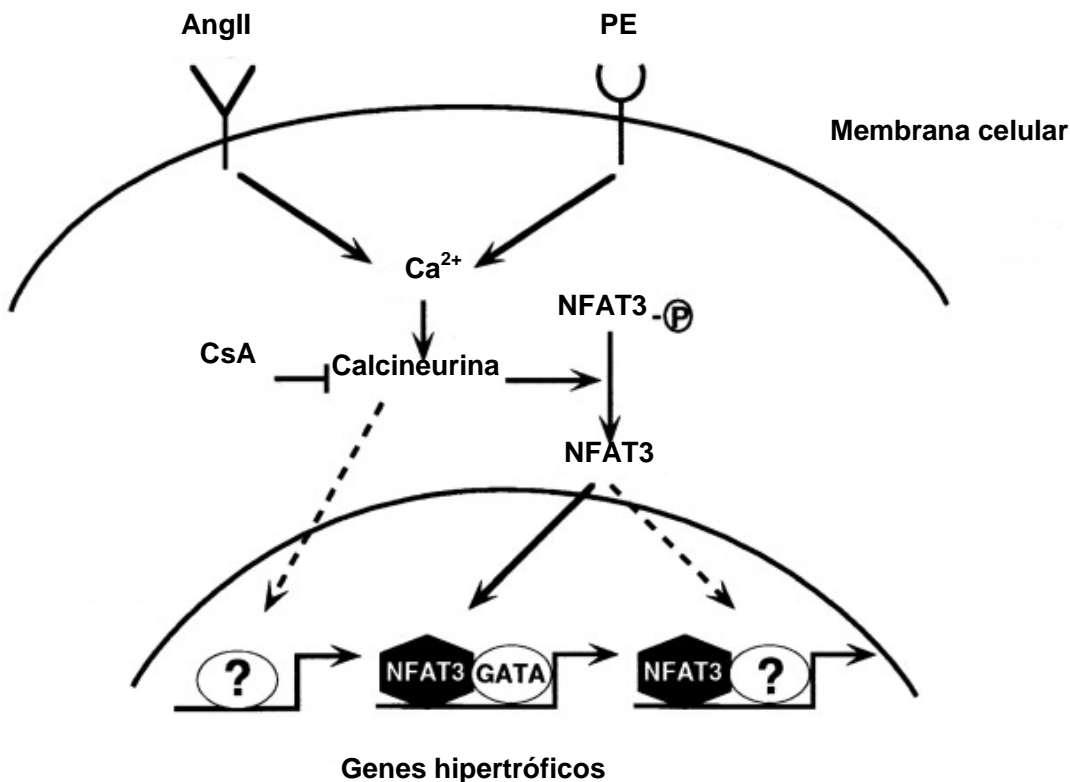


Figura 20. Inducción de hipertrofia por la activación de la vía de calcineurina/NFAT. (Modificado de Molkentin JD. et al, 1998)

2.1.2.2 PI3K/Akt/GSK3/mTOR

La fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) es una familia de enzimas que presenta tanto actividad proteína quinasa como lípido quinasa y se han relacionado con la señalización de numerosas funciones celulares, principalmente con el crecimiento celular, la supervivencia y la proliferación [284]. La PI3K puede activarse por varios receptores como el receptor de IGF-1, el receptor OB y receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) incluyendo receptores α -adrenérgicos [285] y β -adrenérgicos [286, 287]. PI3K puede controlar el tamaño de varios órganos incluyendo el corazón de los mamíferos [288]. Naga Prasad y colaboradores observaron que la PI3K se activa en la hipertrofia por sobrecarga hemodinámica. Además, la sobreexpresión de la PI3K y su sobreactivación de forma constitutiva en un ratón mutante, resulta en una hipertrofia cardiaca [289]. Por el contrario, una disminución de la actividad PI3K conduce a una disminución significativa del ratio peso del corazón/peso corporal en ratones transgénicos de PI3K. Estos cambios se pueden atribuir a diferencias en el tamaño de los cardiomiocitos, indicando eso que PI3K regula la respuesta hipertrófica. Sin embargo, la función cardiaca medida por ecocardiografía no se altera,

sugiriendo un efecto directo de la PI3K en el tamaño de los cardiomiocitos, más que una adaptación secundaria a una contractilidad disminuida. Una de las dianas principales de PI3K es la serina/treonina quinasa Akt, también conocida como proteína quinasa B (PKB). Akt se activa a través de la unión con fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato (PIP3) y una translocación de la misma a la membrana. La activación completa requiere fosforilaciones adicionales, incluyendo una fosforilación por PDK1 (de sus siglas en inglés phosphoinositide-dependent kinase 1) [290]. De forma similar a lo que sucede por la sobreactivación de PI3K, una activación de Akt es suficiente para inducir una hipertrofia cardiaca significativa en ratones sin afectar la función sistólica [291-294].

En cuanto a los mediadores del efecto hipertrófico de Akt, dos de sus efectores directos son los principales candidatos, GSK3 y la vía de mTOR (mammalian target of rapamycin). La rapamicina es un inmunosupresor que se une a su receptor intracelular FKBP12, y este complejo como consecuencia se asocia con mTOR, una serina/treonina quinasa de 290 kDa implicada en la traducción de proteínas. La unión de la rapamicina inhibe la actividad de mTOR resultando en una alteración en la síntesis de proteínas y una disminución del tamaño celular a través de la inhibición de p70S6 quinasa y de 4EBP1/eIF4E [295]. De esta forma, la rapamicina es capaz de atenuar la hipertrofia cardiaca secundaria a la sobreactivación de Akt [291]. Además, la rapamicina bloquea por completo el incremento en el tamaño de los cardiomiocitos inducido por estrés oxidativo [296], por el tratamiento con fenilefrina [297] o con angiotensina II [298] y no se produce la inducción de genes fetales como la α -actina esquelética [299] o el ANF [297], sugiriendo estos resultados que una inhibición selectiva de la traducción de proteínas es suficiente para prevenir las características principales de la respuesta a la hipertrofia.

Además de a mTOR, Akt fosforila de forma directa a GSK-3 β , una quinasa ampliamente expresada que fosforila una serie de residuos de serina/treonina en regiones reguladoras del extremo N-terminal de NFAT [300]. De esta forma enmascaran sus secuencias de translocación al núcleo y promueven su translocación al citosol y su inactivación transcripcional. La actividad de GSK-3 β está regulada por el estado de la fosforilación de su residuo serina 9. La fosforilación en este sitio crea un pseudosustrato inhibitorio para la propia enzima, dejándola inactiva.

Por otro lado, GSK-3 β puede fosforilar otros factores de transcripción además de NFAT, incluyendo c-Jun [301], c-myc [302], STAT [303] y NF- κ B [304]. Todos ellos se han relacionado, directa o indirectamente, con la hipertrofia cardiaca y pueden mediar el efecto de GSK-3 β . Además, el factor de transcripción GATA4, que regula algunos genes cardio-específicos [305] y es suficiente para inducir hipertrofia cardiaca [306] también se fosforila por GSK-3 β [307]. La fosforilación de GATA4 resulta en una salida de GATA4 del núcleo y de esta forma se inhibe la transcripción dependiente de GATA4

GSK-3 β también puede tener efectos antihipertróficos por vías no transcripcionales. GSK-3 β fosforila el factor de iniciación de eucariotas (EIF) 2B [308], inhibiendo así la traducción proteica y por tanto la hipertrofia de los cardiomiocitos. Todos estos datos indican que GSK-3 β integra señales de varias vías pro-hipertróficas y que además, hay una relación entre PI3K/Akt/GSK-3 β y otras vías hipertróficas, particularmente con la vía calcineurina/NFAT, indicando una fuerte interdependencia de estas dos cascadas relacionadas con el crecimiento en el corazón.

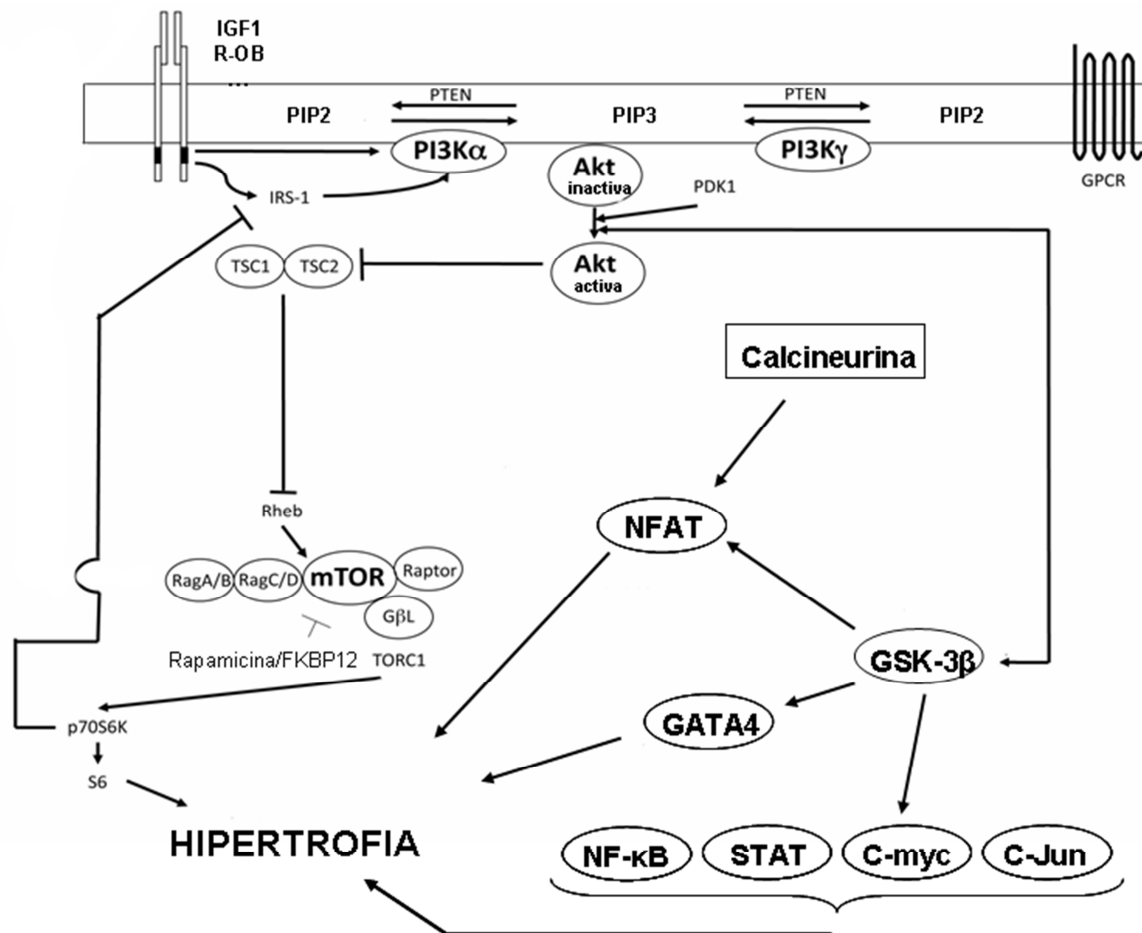


Figura 21. Inducción de hipertrofia por la activación de la vía de PI3K/Akt/GSK3/mTOR.

2.1.2.3 MEF2/HDAC

Numerosas moléculas de señalización dependiente del calcio, incluida la calcineurina, la proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK), y las MAP quinasas son suficientes para evocar un fenotipo hipertrófico en los cardiomiocitos y para inducir una reprogramación del programa de expresión génica en el corazón [309, 310]. Teniendo en cuenta que numerosas vías de señalización pueden producir respuestas similares, parece probable que las vías hipertróficas converjan en algunas dianas. Un gran candidato a ser una de esas dianas es el factor de transcripción MEF2, que integra muchas señales dependientes de calcio/calmodulina en las células musculares, en neuronas y en linfocitos T [311].

En los vertebrados 4 genes diferentes codifican distintas isoformas de MEF2, pero solo 2 isoformas se expresan en el miocardio. Para ser activas necesitan estimulación previa [312]. La actividad de MEF2 está controlada directamente por su unión a histona desacetilasas (HDACs) [311]. Las

HDACs desacetilan histonas del nucleosoma y por tanto, promueven la condensación de la cromatina y la represión de la transcripción mediante la unión a factores específicos como el MEF2. La actividad de las HDAC es la opuesta a la de las histona acetiltransferasas (HATs), que relajan la cromatina y así activan sus genes diana. Las HDAC se pueden categorizar en tres clases, de las cuales las de clase II se expresan en mayor medida en el músculo estriado y las neuronas [313].

Existen evidencias de que algunos estímulos hipertróficos como la sobrecarga de presión y la activación de la calcineurina resultan en una activación de HDAC que regula la asociación con MEF2 [314]. Por otro lado, la sobreexpresión de CaMK es suficiente para inducir hipertrofia cardiaca asociada con la actividad de MEF2 [315-317], sin embargo, la no inhibición de HDAC por inhibidores de CaMK sugiere que otras quinasas participan en la activación de HDAC.

En conjunto, los datos publicados hasta la fecha, apoyan la teoría de que muchos de los estímulos hipertróficos convergen en el núcleo y que las HDAC de clase II y el factor de transcripción MEF2, mediante interacción con otros factores como GATA y NFAT, constituyen los principales integradores de estas señales hipertróficas.

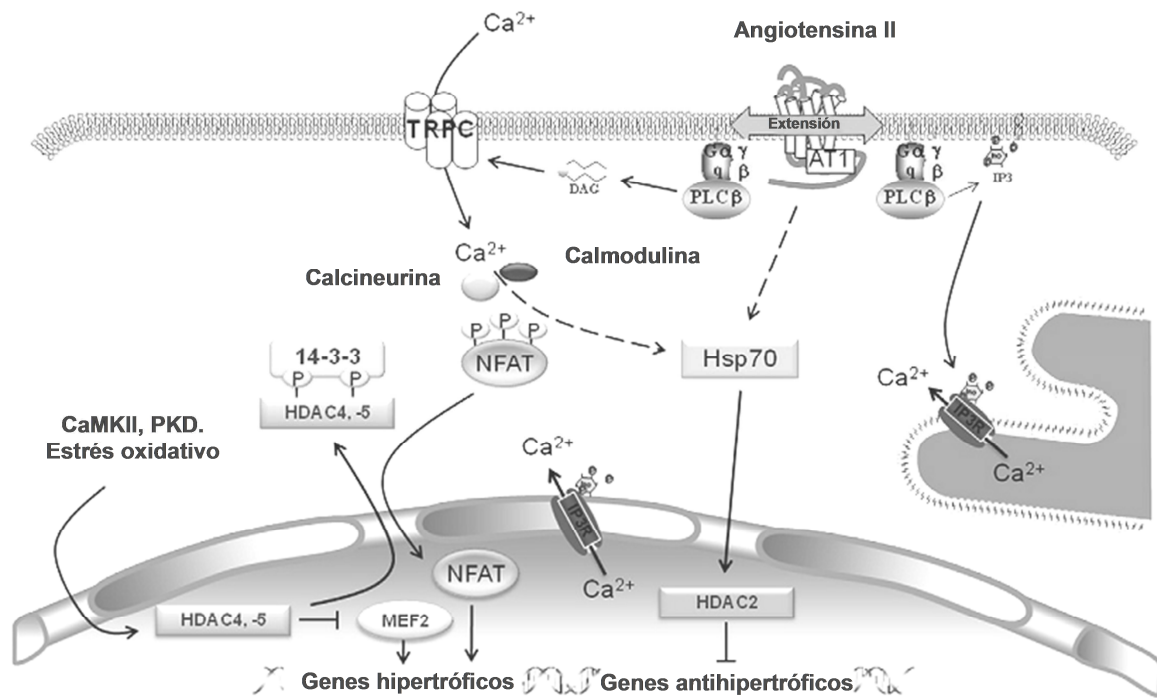


Figura 22. Inducción de hipertrofia por la activación de la vía de MEF2/HDAC. (Modificado de Kurdi M. et al., 2011)

2.1.2.4 RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) juegan, asimismo, un papel fundamental en la regulación de la función cardíaca y la adaptación a cambios en la hemodinámica [318]. Los GRPC más importantes a nivel cardíaco incluyen a los receptores adrenérgicos (entre los que se han descrito varios subtipos de receptores α y β adrenérgicos) y receptores muscarínicos. Estos receptores heptahelicoidales se unen principalmente a tres clases de proteínas de unión a GTP heteroméricas, Gs, Gq/G11 y Gi, que se encargan de la transducción de señales al interior celular. Todas las proteínas G heteroméricas están formadas por subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$, que cuando el receptor se activa se disocian y activan de forma independiente diversas vías de señalización intracelular.

2.1.2.4.1 PROTEÍNAS Gq/G11

Los receptores de angiotensina II, de endotelina I y los receptores α -adrenérgicos se encuentran acoplados a proteínas Gq/G11, y se ha visto que son suficientes para mediar la hipertrofia de los cardiomiocitos cuando son estimulados por sus respectivos agonistas [319]. Además, la sobreexpresión de estos receptores [320, 321] así como de su mediador Gq [322, 323] conduce a

hipertrofia cardiaca y posteriormente a una cardiomiopatía con la función contráctil disminuida. Por el contrario, una ablación combinada de Gq y G11 resulta letal para el embrión debido a una hipoplasia del miocardio, sugiriendo la importancia de estos mediadores en el control del tamaño y el crecimiento cardiaco [324]. En el adulto, cuando ratones KO para G11 (que son viables y no parecen presentar defectos cardiacos obvios) se cruzan con ratones que portan el alelo condicional para Gq y posteriormente con ratones que expresan Cre recombinasa de forma cardio-específica, el fenotipo resultante es una ausencia casi completa de hipertrofia cardiaca o activación del programa de genes fetales en respuesta a una ligadura de la aorta [325], demostrando la necesidad de Gq/G11 para la mayor parte de los modelos de hipertrofia cardiaca por sobrecarga hemodinámica. De una forma similar, la sobreexpresión de un dominante negativo de Gq atenúa la respuesta a la sobrecarga hemodinámica inducida por ligadura de la aorta [326].

Por otro lado, existen evidencias indirectas de que la señalización dependiente de Gq juega un papel fundamental en la hipertrofia provenientes de observaciones clínicas en pacientes con cardiomiopatía, en los que los bloqueantes de receptores de Angiotensina II y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina confieren efectos beneficiosos, como la inhibición del remodelado cardiaco, que exceden sus propiedades antihipertensivas [327].

2.1.2.4.2 PROTEINAS Gs

El receptor adrenérgico más abundante en el tejido cardiaco es el receptor β 1-adrenérgico acoplado a proteínas Gs, que activa a la adenilato ciclasa (AC) y que finalmente resulta en unos efectos cronotrópicos, inotrópicos y lusitrópicos positivos en el corazón. El receptor β 2-adrenérgico es menos abundante y puede unirse tanto a proteínas Gs como Gi, que pueden asimismo regular la señalización β -adrenérgica [328].

La sobreexpresión de receptores β 1-adrenérgicos inicialmente conduce a un incremento de la función contráctil y la respuesta a isoproterenol, pero finalmente resulta en deterioros progresivos de la función cardiaca, hipertrofia de los cardiomiocitos y fibrosis [329, 330].

Por el contrario, cuando se sobreexpresa la adenilato ciclasa tipo VI, esta no parece ejercer efectos adversos en la función cardiaca y sí atenuar cambios inducidos en los cardiomiocitos, incluyendo la hipertrofia en ratones transgénicos de la proteína Gq [331, 332]. Sin embargo, cuando se

sobreexpresa la principal diana de la adenilato ciclasa, la PKA, el resultado es una cardiomiopatía dilatada asociada a hipertrofia y fibrosis, sugiriendo este hecho que la PKA media las consecuencias negativas de la elevación crónica de la señal β -adrenérgica y que la adenilato ciclasa probablemente tiene otras dianas aún desconocidas, que median efectos cardioprotectores [333].

2.1.2.4.3 PROTEINAS Gi

Los receptores cardiacos muscarínicos y los β 2-adrenérgicos cardiacos se encuentran acoplados a través de proteínas Gi, inhibiendo de este modo la adenilato ciclasa y oponiéndose de forma directa a la señalización dependiente de proteínas Gs.

Las proteínas Gi se encuentran reguladas al alza en insuficiencia cardíaca en humanos [334-336] y la actividad basal de la Adenilato Ciclasa se encuentra alterada, sugiriendo que este mecanismo puede contribuir a la cardiomiopatía. Además, la proteína Gi se regula al alza en la hipertrofia hipertensiva antes del desarrollo de insuficiencia [336], indicando también que la regulación al alza de la proteína Gi puede preceder la descompensación.

En resumen, la sobreexpresión de las proteínas Gi acopladas a receptores GPCR resultan en cardiomiopatía y en arritmias letales [337].

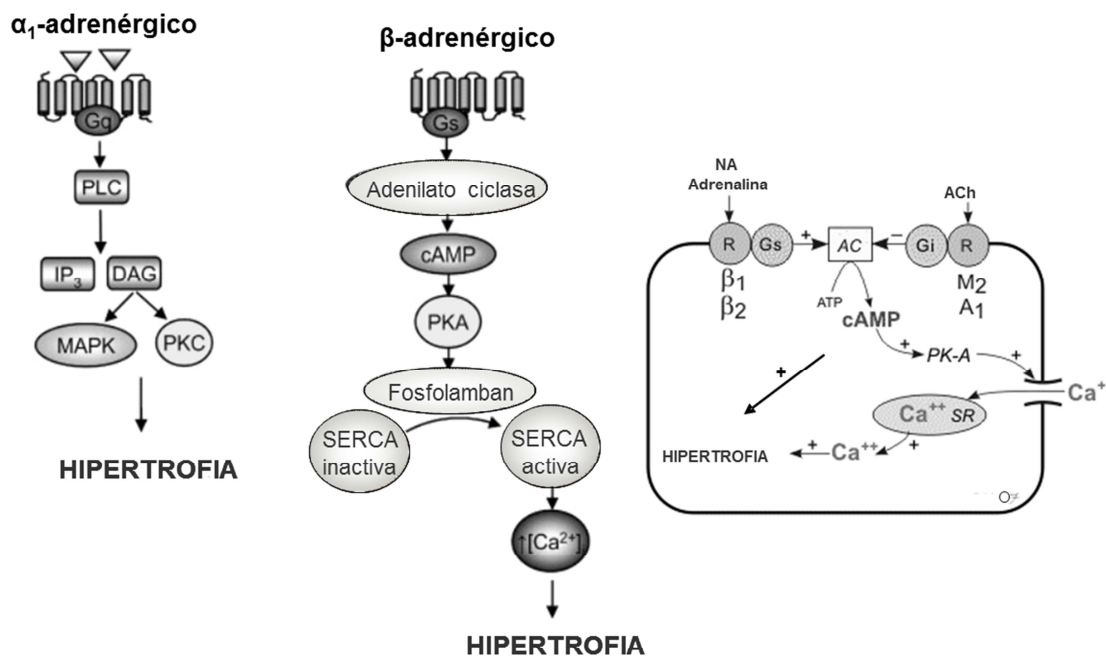


Figura 23. Inducción de hipertrofia por la activación de proteínas Gq, Gs y Gi. (Modificado de Barry SP et al., 2008)

2.1.2.4.4 PROTEINAS G DE BAJO PESO MOLECULAR

Las proteínas G de bajo peso molecular, son un enlace entre receptores de membrana y varias vías de señalización intracelular. Esta familia de proteínas G está constituida por varios miembros que regulan procesos celulares como el crecimiento, la división y la supervivencia celular, la organización del citoesqueleto, el tráfico de membrana y la motilidad celular. Comparten una masa similar en torno a los 21 kDa y la capacidad de activarse al unirse a GTP. Tienen actividad GTPasa, por lo que pueden hidrolizar GTP en GDP en un proceso regulado por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs). Se han descrito 5 familias de proteínas G de bajo peso molecular, Rho, Ras, ARFs, Rab y Ran, cada una formada por varios miembros [338].

La familia Ras fue la primera en implicarse en la hipertrofia cardíaca [339, 340]. La señalización por Ras está acoplada a varios efectores, como Raf, PI3K, Ral-GSD/Rac y las MAPK, todos ellos relacionados con la hipertrofia cardíaca. Además, Ras puede promover la translocación al núcleo de NFAT3, dando lugar a la activación de vías pro-hipertróficas [341].

La familia Rho está formada por Rho, Rac y Cdc42 y regula la organización del citoesqueleto en células no musculares [342] y en cardiomiocitos [343]. Además, puede activar cascadas pro-hipertróficas en células musculares. RhoA activa varias proteínas quinasas entre las que se encuentra ROCK, que finalmente activa la proteína quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK). MLCK, que también se activa por calcio/calmodulina, puede inducir una reorganización de los sarcómeros, que es una de las características más importantes del fenotipo hipertrófico [344].

Recientemente también se ha implicado a la familia Rab en la hipertrofia cardíaca. La sobreexpresión de Rab parece ser suficiente para inducir hipertrofia de los cardiomiocitos y finalmente insuficiencia cardíaca [345].

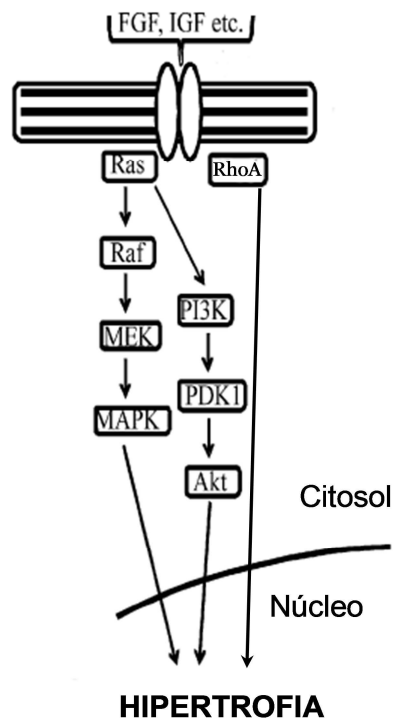


Figura 24. Inducción de hipertrofia por la activación de proteínas G de bajo peso molecular. (Modificado de Rohini A. et al., 2010)

2.1.2.5 MAPK

La vía de las MAPK es un enlace importante entre los estímulos extracelulares y el núcleo a través de la fosforilación y regulación de múltiples factores de transcripción. Las MAPK se pueden dividir en tres subfamilias: Las quinasas activadas por estímulos extracelulares (ERKs), las quinasas de c-Jun en el N-terminal (JNKs) y las p38. Los últimos dos grupos también se conocen como MAPK activadas por estrés.

Aún no está muy claro el papel de ERK1/2 en la respuesta a estímulos hipertróficos puesto que una depleción de ERK y de la quinasa activadora de ERK (MEK1/2) parecen atenuar la respuesta hipertrófica a varios estímulos [346, 347] pero no inhibir la inducción de ANF, un gen relacionado con la hipertrofia cardíaca [348]. Por otro lado, la activación de ERK1/2 en determinadas condiciones parece ser suficiente para evocar un fenotipo hipertrófico [349].

Las JNKs en cardiomiocitos se activan por un estrés mecánico [350] o por la estimulación de las vías de Endotelina- 1 [351] o Angiotensina II [352]. Tanto las JNK como su quinasa reguladora MEKK1 se han implicado en la respuesta hipertrófica de los cardiomiocitos secundaria a la estimulación de receptores acoplados a proteínas Gq [353].

En cuanto a la familia p38, también se han implicado sus principales activadores, MKK3 y MKK6, en la hipertrofia cardiaca y la inducción de ANF [354]. Además, p38 puede activar varios factores de transcripción implicados en la hipertrofia cardiaca como MEF2 [355] y NFAT3 [356].

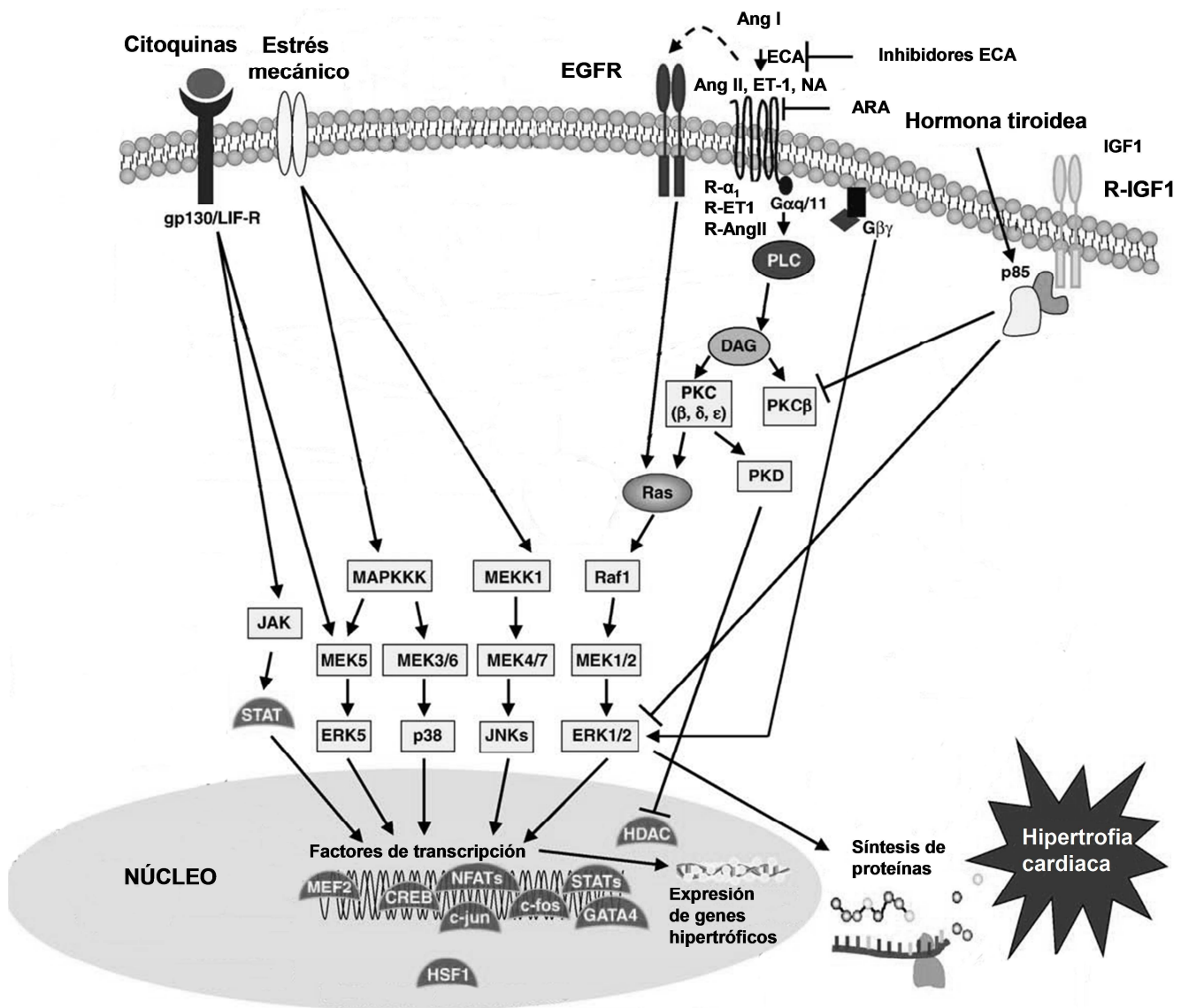


Figura 25. Inducción de hipertrofia por la activación de MAPK. (Modificado de Bernardo BC. et al., 2010)

2.1.2.6 PKC

La PKC es una serina/treonina quinasa ubicua y activada fundamentalmente por receptores acoplados a proteínas Gq/G11. Varias isoformas de la PKC se han implicado en la patogénesis de la hipertrofia cardíaca. La sobreexpresión de la PKC conduce a hipertrofia cardíaca y muerte súbita [357], sin embargo, no es necesaria para la respuesta hipertrófica a una sobrecarga de presión [358].

2.1.2.7 Gp130/STAT-3

Gp130 es un receptor capaz de ser activado por varias citoquinas incluyendo la interleuquina 6/11, el factor inhibitorio de la leucemia (LIF) y la cardiotrofina-1 (CT-1). La activación de este receptor

conduce a la activación de MAPK y de la vía de JAK/STAT [359]. Concretamente, STAT-3 se transloca al núcleo en respuesta a la activación de Gp130 y resulta en la inducción de genes implicados en la hipertrofia cardíaca y en vías de supervivencia [360]. Por tanto, una sobreexpresión o sobreactivación de STAT-3 es suficiente para inducir hipertrofia en los cardiomiocitos [361, 362]. Además, esta vía es fundamental para la adaptación del corazón al estrés biomecánico porque también promueve la supervivencia de los cardiomiocitos.

2.1.2.8 MMP

Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) son una familia de enzimas implicadas en el metabolismo de la matriz y que se regulan al alza en el remodelado cardíaco que ocurre tras un infarto de miocardio. Además, la activación de las MMPs parece contribuir a la dilatación progresiva del corazón insuficiente [363]. En este sentido, la inhibición de las MMPs atenúa la hipertrofia cardíaca y la dilatación secundaria a una sobrecarga de presión [364].

2.1.3 PROGRAMA DE GENES HIPERTRÓFICOS

Las vías de señalización intracelular que se activan durante el proceso hipertrófico están acopladas a factores de transcripción que en el núcleo regulan las alteraciones a largo plazo que se producen en determinados genes asociados con la hipertrofia cardíaca. La hipertrofia patológica se ha asociado con la regulación al alza de genes fetales entre los que se encuentran el péptido natriurético atrial (ANP), el péptido natriurético cerebral (BNP), la α -actina esquelética (SKA), la cadena ligera de la miosina atrial (MLC-1) y la cadena pesada de la β -miosina (β -MHC) y con la regulación a la baja de genes expresados a niveles altos en condiciones normales en el ventrículo izquierdo como la cadena pesada de la α -miosina (α -MHC) y la SERCA2a [365-367].

De entre todos ellos, la cadena pesada de la miosina (MHC), que es el componente fundamental de la miosina, el complejo proteico responsable de la contracción en las células musculares, es el que con más frecuencia se ha asociado con el proceso hipertrófico. En roedores, la β -MHC es la isoforma predominante en el corazón neonatal, pero se regula a la baja poco después del nacimiento cuando se expresa la α -MHC [368]. En la hipertrofia patológica se observa un incremento en la expresión de la β -MHC y una disminución de la α -MHC que puede suponer una respuesta

adaptativa, puesto que la β -MHC cataliza la hidrólisis del ATP de forma más lenta que la α -MHC, dando lugar a una función contráctil con un menor gasto energético [369-371].

Sin embargo, la reexpresión de genes fetales no ocurre en todos los modelos de hipertrofia y aún no se conoce el impacto directo de la misma.

Para complicar aún más el escenario, algunos modelos en los que el fenotipo cardiaco es normal se han asociado también con una reexpresión del programa fetal [372].

2.1.4 HIPERTROFIA FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA

La hipertrofia cardiaca se puede clasificar a grandes rasgos en fisiológica (normal) o patológica (perjudicial). El crecimiento fisiológico del corazón incluye el crecimiento post-natal, el crecimiento inducido por el embarazo y la hipertrofia cardiaca inducida por el ejercicio. Por el contrario, el crecimiento patológico ocurre en respuesta a una sobrecarga de presión o volumen durante una patología como la hipertensión o patologías valvulares, en respuesta a un infarto de miocardio o isquemia asociada con enfermedad coronaria o anomalías en la función cardiaca que conducen a una cardiomiopatía, como pueden ser alteraciones genéticas o diabetes.

Tanto la hipertrofia fisiológica como la patológica se asocian con un incremento en el tamaño del corazón, sin embargo, la hipertrofia patológica también se asocia con una pérdida de cardiomiocitos y un reemplazo de los mismos por tejido fibrótico y viene acompañada de disfunción cardiaca y un aumento del riesgo de padecer insuficiencia cardiaca y muerte súbita [373, 374]. Por el contrario, la hipertrofia fisiológica se asocia a una estructura cardiaca normal o incluso una mejora en la función cardiaca y puede ser reversible en el caso de la hipertrofia inducida por ejercicio o por un embarazo [375-377].

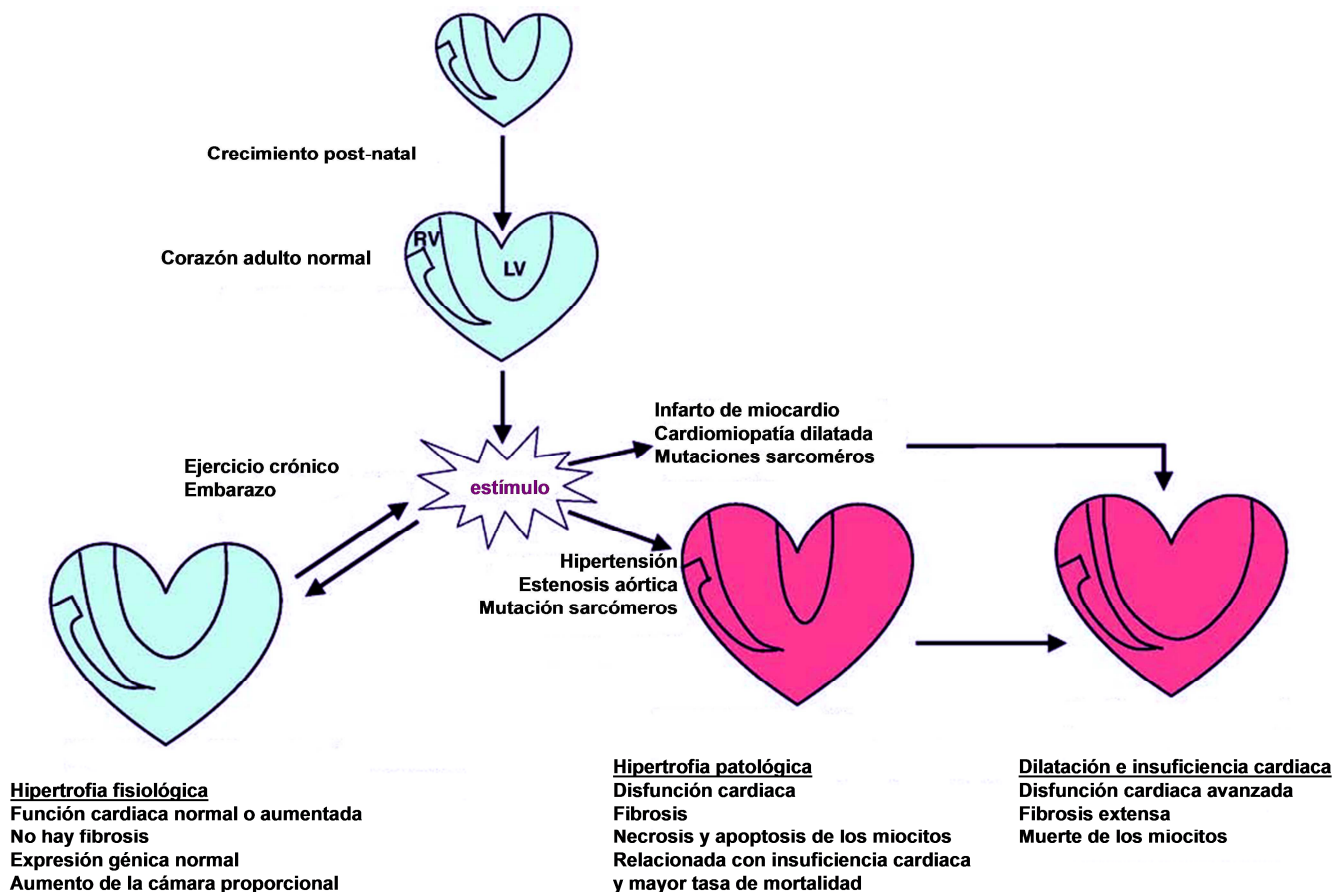


Figura 26. Diferencias entre la hipertrofia fisiológica y patológica. (Modificado de Bernardo BC. et al., 2010)

2.1.4.1 HIPERTROFIA CONCÉNTRICA Y EXCÉNTRICA

La hipertrofia patológica y fisiológica tradicionalmente se ha dividido en concéntrica y excéntrica. Estas clasificaciones se basan en cambios en la forma que dependen del estímulo inicial [378, 379]. Se llama hipertrofia concéntrica a la que se desarrolla con un incremento en el grosor de la pared del ventrículo y la masa del corazón y con una pequeña reducción o sin cambios del volumen de la cámara. Se caracteriza por un patrón de adición de sarcómeros en paralelo que conduce a un incremento en la anchura de los miocitos. La hipertrofia excéntrica es la que se caracteriza por un incremento en la masa cardíaca acompañado de un incremento del volumen de la cámara. El grosor de la pared ventricular puede ser normal o estar incrementado o disminuido. La adición de los sarcómeros en este caso es en serie y conduce a un incremento en la longitud de los miocitos [378].

Estímulos patológicos que causan una sobrecarga de presión como la estenosis aórtica o la hipertensión, producen un incremento en el estrés de la pared en la sístole que resultan en una hipertrofia concéntrica [378]. Por el contrario, estímulos que causan sobrecarga de volumen como

las fístulas arteriovenosas producen un incremento en el estrés de la pared en la diástole que resulta en una hipertrofia excéntrica [378, 379].

Los estímulos fisiológicos pueden producir también hipertrofia concéntrica o excéntrica. Un ejercicio aeróbico o el embarazo aumentan el retorno venoso al corazón dando lugar a una sobrecarga de volumen y por tanto una hipertrofia excéntrica [275, 379, 380]. Este tipo de hipertrofia excéntrica se caracteriza por un aumento del tamaño de la cámara proporcional con los cambios que se producen en el grosor de la pared, mientras que la hipertrofia excéntrica que se establece como consecuencia de un estímulo patológico generalmente se asocia con un estrechamiento de las paredes ventriculares.

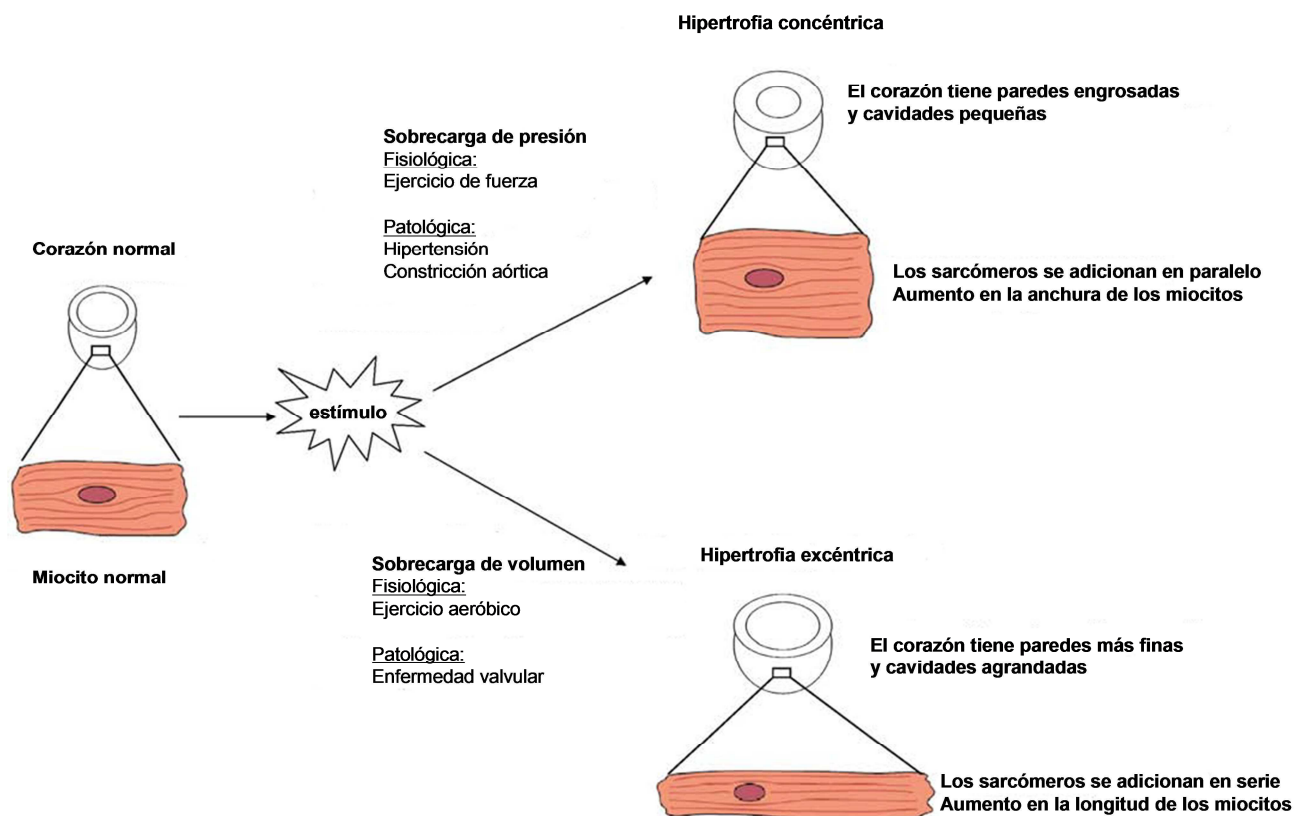


Figura 27. Diferencias entre la hipertrofia concéntrica y excéntrica. (Modificado de Bernardo BC. et al., 2010)

2.1.4.2 CARACTERÍSTICAS DE LA HIPERTROFIA FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA

A pesar de que se pueden producir aumentos de tamaño comparables, la hipertrofia fisiológica y la hipertrofia patológica presentan distintas características a nivel estructural, funcional, metabólico y molecular

Característica	Hipertrofia patológica	Hipertrofia fisiológica
Estímulo	Enfermedad Sobrecarga de presión o volumen Cardiomiopatía	Ejercicio aeróbico Crecimiento post-natal Embarazo
Morfología cardiaca	Aumento del volumen de los miocitos Formación de nuevos sarcómeros Aumento del tamaño del corazón	Aumento del volumen de los miocitos Formación de nuevos sarcómeros Aumento del tamaño del corazón
Fibrosis	Sí	No
Apoptosis	Sí	No
Expresión de genes fetales	Regulación al alza de ANP, BNP, β-MHC y SKA	Relativamente inalterada
Expresión de genes asociados a la función contráctil	Regulación a la baja de SERCA2a, α-MHC	Normal o aumentada
Función cardiaca	Deprimida	Normal o aumentada
Metabolismo	Disminución de oxidación de ácidos grasos Aumento del consumo de glucosa	Aumento de la oxidación de ácidos grasos Aumento del consumo de glucosa
Reversible	No	Sí
Asociación con insuficiencia cardiaca y mortalidad	Sí	No

Tabla 3. Características de la hipertrofia fisiológica y patológica

2.1.4.2.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES

La hipertrofia cardiaca se asocia con un remodelado estructural de los componentes de las paredes ventriculares para dar cabida a los miocitos con un tamaño aumentado, incluyendo cambios en la red de colágeno fibrilar y la angiogénesis. En condiciones basales o durante la hipertrofia fisiológica la red de colágeno fibrilar confiere una integridad estructural a los miocitos embebidos en esa red, que les facilita la contracción y se traduce en una función de bomba eficiente [268]. La hipertrofia patológica se asocia a muerte celular por apoptosis o necrosis y a una pérdida de miocitos que se reemplazan con colágeno (proceso fibrótico). El colágeno fibrilar más abundante en la fibrosis es el tipo 1. Una acumulación excesiva de este colágeno da rigidez al ventrículo y

dificulta la contracción y relajación impidiendo el acoplamiento eléctrico de los miocitos cardiacos con las proteínas de matriz extracelular y reduce la densidad de capilares. Esta fibrosis y la reducción en la densidad de capilares aumenta la distancia de difusión del oxígeno, dando lugar a isquemia cardiaca, que podría contribuir a la transición de hipertrofia a insuficiencia cardiaca [268].

2.1.4.2.2 METABOLISMO CARDIACO

En el corazón normal sano, la oxidación de ácidos grasos es la principal vía metabólica responsable de la generación de energía, dando lugar al 60%-70% de la generación de ATP [381]. El metabolismo de la glucosa y el lactato suponen aproximadamente un 30% de la producción de ATP. El corazón es capaz de cambiar los sustratos energéticos dependiendo de la carga y de la concentración relativa de estas moléculas energéticas en el torrente sanguíneo [381]. Esta capacidad de cambiar el sustrato se considera un mecanismo adaptativo que permita al corazón tener un abastecimiento continuo de ATP en condiciones fisiológicas (ayuno, ejercicio...)

La hipertrofia cardiaca patológica se asocia con una disminución en la oxidación de ácidos grasos y un incremento en el metabolismo de la glucosa [382-384]. Este cambio de sustrato principal puede ser un mecanismo protector, que permite al corazón producir más ATP por molécula de oxígeno consumida [385].

Por el contrario, en la hipertrofia fisiológica inducida por el ejercicio se observa un incremento tanto en la oxidación de ácidos grasos como en la oxidación de glucosa [386].

2.1.4.2.3 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

Desde finales de la década de los 70 se sabe que la hipertrofia fisiológica inducida por ejercicio físico o por la hormona tiroidea, se asocia con aumentos de la actividad ATPasa de la miosina y un incremento de la contractilidad, mientras que la hipertrofia patológica se asocia con una disminución de la actividad ATPasa de la miosina [387, 388]. Además, el patrón génico difiere entre la hipertrofia fisiológica y la patológica [389]. La hipertrofia patológica se asocia con alteraciones en las proteínas contráctiles (cadena pesada de la α - y β -miosina) aumento en la expresión de genes fetales (ANP, BNP y α -actina esquelética) y disminución de las proteínas relacionadas con la homeostasis del calcio como la SERCA2a.

2.2 INSUFICIENCIA CARDIACA

La insuficiencia cardiaca es la principal causa de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. La incidencia de la insuficiencia cardiaca continúa aumentando en mayores de 65 años y afecta casi a 1 de cada 100 individuos [390]. Las causas más frecuente de desarrollo de insuficiencia cardiaca es la aterosclerosis y una enfermedad isquémica concomitante. Pero, además, otras causas importantes incluyen la hipertensión, que conduce a hipertrofia que puede degenerar en una cardiomiopatía dilatada e insuficiencia cardiaca, cardiomiopatías dilatadas no isquémicas y causas genéticas.

La insuficiencia cardiaca inicialmente implica un fallo en el miocardio, que da lugar una disminución de la función cardiaca, pero rápidamente afecta a otros órganos en los sistemas neurohumoral, vascular y renal. Los pacientes con insuficiencia cardiaca, de hecho, presentan una activación crónica del sistema nervioso simpático, derivado de un cambio maladaptativo destinado a mantener la función cardiaca.

2.3 REMODELADO ELÉCTRICO EN HIPERTROFIA E INSUFICIENCIA CARDIACA

2.3.1 FISIOLOGÍA DE LOS MIOCITOS CARDIACOS. POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO (PA)

Las células cardiacas en reposo mantienen un potencial de membrana que oscila entre -80 y -90 mV. El ion encargado de mantener dicho potencial es el potasio (K^+) ya que la membrana es más permeable para el potasio que para otros iones. Así, el K^+ fluye al exterior o al interior de la célula compensando las cargas a ambos lados de la membrana, de forma que la diferencia de potencial sea siempre la misma. Este gradiente de concentraciones se mantiene gracias a la actividad de distintas bombas, principalmente la bomba Na^+/K^+ y el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX), presentes en las membranas de los cardiomiocitos. Los iones Na^+ penetrarán al interior de la célula mientras que los iones de K^+ tenderán a salir siguiendo un gradiente de concentraciones. A niveles negativos de potencial de membrana los canales de Na^+ están cerrados y no permiten el paso del Na^+ al interior de la célula. La bomba Na^+/K^+ está activa, de tal forma que saca Na^+ de la célula a la vez que permite la entrada de K^+ contra gradiente de concentración en razón 3:2. Además, existe un canal de K^+ cuya activación genera una corriente de entrada de K^+ denominada corriente de rectificación de

entrada (I_{K1}), que a potenciales negativos se encuentra abierto favoreciendo la entrada de K^+ al interior de la célula. Por tanto, el citosol es un medio rico en K^+ y bajo en Na^+ , al contrario que el medio extracelular.

Durante la excitación eléctrica, las células pueden variar su potencial de membrana, desencadenando el potencial de acción. La onda eléctrica que llega a los miocitos modifica las propiedades de la membrana dando lugar a la activación de canales iónicos que dejan pasar iones como el Na^+ y el Ca^{2+} .

El potencial de acción consta de cinco fases, dos fases en las que se produce una despolarización del potencial de membrana (se desplaza a valores más positivos) al activarse corrientes de Na^+ y Ca^{2+} . Y otras dos fases en las que se restablece el potencial de reposo o fases de repolarización, en las que el potencial de membrana se hace más negativo al activarse corrientes de K^+ repolarizantes.

FASE 0. DISPARO DEL PA

En estado de reposo, los canales de K^+ se encargan de mantener el potencial de membrana, pero al alcanzarse el umbral de disparo del potencial de acción, en torno a los -65 mV, los canales de Na^+ se abren rápidamente, dando lugar al disparo del potencial de acción. Durante un corto espacio de tiempo, entra mucho Na^+ al interior celular y la membrana se despolariza (se hace menos negativa), alcanzando valores de en torno a -40 mV. Tras unos segundos los canales selectivos para el Na^+ se inactivan y comienza la repolarización

FASE 1. REPOLARIZACIÓN TEMPRANA

El final de la fase 0 se alcanza cuando se inactivan los canales de Na^+ y se activan los de K^+ . En esta fase, se produce una repolarización rápida llevada a cabo por la corriente transitoria de potasio (I_{to}). La duración de esta fase es variable en función de la especie y de la región anatómica del corazón [391, 392]. Así, los potenciales de acción de las células de la zona apical y de las células de Purkinje presentan una fase 1 más grande que las células del septum.

FASE 2. FASE DE MESETA (*PLATEAU*)

La fase 2 es una etapa repolarizadora más lenta que la anterior ya que la corriente de calcio tipo L (I_{CaL}) previene la repolarización llevada a cabo por las corrientes de K^+ . La corriente repolarizante

más importante en esta fase es la corriente de rectificación retardada de K^+ (I_K), tanto el componente rápido (I_{Kr}) como el componente lento (I_{Ks}). La I_{to} también puede contribuir en la fase temprana de la meseta. La corriente despolarizante más importante en esta fase del PA es la corriente de calcio tipo L, aunque se ha descrito una contribución de la corriente de sodio (I_{Na}) que se inactiva lentamente.

FASE 3. REPOLARIZACIÓN TARDÍA

La inactivación de los canales de Ca^{2+} marca el final de la fase de meseta. En este punto solo las corrientes repolarizantes permanecen activadas y, por tanto, la restauración del potencial de membrana será más rápida. Cuando el potencial se hace más negativo, la I_K se inactiva y predomina la I_{K1} .

FASE 4. FASE DE LENTA DESPOLARIZACIÓN DIASTÓLICA

En las células no automáticas, el potencial de reposo permanece constante durante la diástole. En estas células, la I_{K1} es la corriente que predomina durante el estado de reposo. Así, las células mantienen un potencial de reposo estable hasta que un nuevo estímulo eléctrico lo varía, llevándolo hasta el umbral que desencadenará un nuevo PA.

En las células automáticas, el potencial de membrana en la fase 4 no permanece constante. Se produce una lenta despolarización espontánea que lleva el potencial de membrana hasta el potencial umbral dando lugar al disparo del PA. En estas células el potencial de reposo oscila entre -50 mV y -60 mV y son menos permeables al K^+ , lo que explica que la repolarización sea menor. Las corrientes de Ca^{2+} son las encargadas de disparar el PA, lo que explica que el disparo sea más lento.

PERIODO REFRACTARIO

Se llama periodo refractario al intervalo de tiempo durante el cual no se puede establecer un segundo PA. Aunque se produce en todas las células excitables, la duración del mismo en las células cardiacas es más larga que en otras células como neuronas y células del músculo esquelético.

2.3.2 CORRIENTES IÓNICAS IMPLICADAS EN EL PA

Durante el PA se producen intensas variaciones de voltaje. En primer lugar tiene lugar una despolarización y a continuación un retorno al potencial de reposo. Todas estas variaciones del voltaje son consecuencia de la activación de varias corrientes iónicas.

En los cardiomiocitos, la recuperación de la excitabilidad por repolarización de la membrana celular está controlada por un delicado balance entre las corrientes de entrada y salida de iones. Un incremento relativo de las corrientes de entrada frente a las de salida de iones conduce a la prolongación del potencial de acción.

2.3.2.1 CORRIENTES DE SODIO (I_{Na})

La I_{Na} es la corriente encargada de excitar las células cardiacas de la aurícula, el ventrículo y las fibras de Purkinje. Es una corriente despolarizante de entrada, cuyo canal permanece cerrado durante el potencial de reposo. Se activa en la fase 0 del PA cuando se alcanza el potencial umbral. Durante un periodo corto de tiempo fluyen iones Na^+ al interior celular, dando lugar a la despolarización de la membrana. A su vez, se desencadena la inactivación rápida del canal y la activación de canales de K^+ y Ca^{2+} . Una vez desencadenado el PA es la bomba Na^+/K^+ la encargada de restablecer el gradiente de Na^+ en el interior celular.

Este canal se regula por diversos neurotransmisores como la noradrenalina, y diversas quinasas como la PKA y la PKC que modifican la cinética del canal. El cadmio, el zinc y la tetrodotoxina (TTX) bloquean el canal de Na^+ .

2.3.2.2 CORRIENTES DE CALCIO

Hay dos tipos de canales por donde puede fluir el calcio, el canal de Ca^{2+} tipo L (del inglés long lasting, larga duración) y el canal de Ca^{2+} tipo T (transient current, o corriente transitoria y Tiny conductance o conductancia minúscula).

La corriente de calcio tipo T (I_{CaT}) es una corriente de bajo umbral, cinética rápida y conductancia pequeña. Se activa e inactiva a potenciales de membrana cercanos al potencial de reposo y su inactivación es muy rápida. Es relativamente insensible a las dihidropiridinas o al cadmio, pero se bloquea con níquel. En el ventrículo esta corriente aparece sobre todo en estadios fetales y

desaparece posteriormente. Sin embargo, puede reaparecer en situaciones como la hipertrofia donde se reexpresan genes fetales [393].

La I_{CaL} o corriente de alto umbral requiere una despolarización significativa del potencial de membrana para su activación y su inactivación es lenta. En situaciones basales, la conductancia es dos veces mayor que la del canal de calcio tipo T. Se activa a potenciales de membrana más despolarizados que la I_{Na} y de forma más lenta. Su umbral de activación es de -35 mV y alcanza el pico de corriente en torno a los 0 mV. Los canales de calcio tipo L son selectivos para ciertos iones divalentes como el Ba^{2+} y el Sr^{2+} y se bloquean con Mn^{2+} , Co^{2+} , La^{2+} o fármacos antagonistas del Ca^{2+} como el verapamilo. La I_{CaL} produce una corriente de entrada sostenida que da lugar a una larga despolarización, responsable de la meseta del PA.

2.3.2.3 CORRIENTES DE POTASIO

Los canales de K^+ proporcionan corrientes de salida de iones que dan lugar a la repolarización. Actúan en la fase 1 del PA o de repolarización temprana, la fase 3 y en la fase de mantenimiento del potencial de reposo. Se han descrito distintos tipos de canales selectivos al K^+ en miocitos [394]:

La I_{to} o corriente transitoria de potasio, cuya amplitud depende del potencial de membrana, es la responsable de la fase 1 del PA. La amplitud de esta corriente también depende de la frecuencia de estimulación (es menor a altas frecuencias de estimulación, dando lugar a prolongaciones del PA). La densidad del canal que codifica la I_{to} difiere en función de la localización de la célula en el miocardio, de la especie y la edad [391, 395, 396]. Se activa rápidamente con la despolarización y es mayor a potenciales muy despolarizados. El umbral de activación es de en torno a -30 mV. La I_{to} tiene una naturaleza transitoria. Su rápida activación es seguida por la inactivación durante la meseta del PA y a causa de su dependencia del voltaje y su curso temporal, se opone a la I_{CaL} . La I_{to} está constituida por dos componentes que se ha descrito que utilizan canales físicamente diferentes, la I_{to1} y la I_{to2} [397]. La I_{to1} es una corriente de K^+ independiente de la concentración de Ca^{2+} intracelular y sensible a 4-aminopiridina (4-AP) y la I_{to2} es dependiente de Ca^{2+} y menos sensible a la 4-AP pero más sensible al cloruro de tetraetilamonio (TEA). La I_{to1} , parece ser la responsable de la mayor parte de la repolarización que tiene lugar en la fase 1 del PA. Esta a su vez está constituida por dos componentes, un componente de inactivación rápida o $I_{to-fast}$ (I_{tof}) y otro de inactivación lenta $I_{to-slow}$ (I_{tos}) [398].

La I_{to1} , sensible a 4-AP, se activa a potenciales cercanos a -30 mV de forma rápida, sin embargo, la inactivación es algo más lenta.

La I_K o corriente de rectificación retardada de potasio es la corriente repolarizadora más importante implicada en la fase 3 de repolarización del PA [399, 400]. La I_K se activa lentamente en torno a los -40 mV y no se inactiva con el tiempo, por tanto, la I_K aumenta gradualmente durante la despolarización sostenida cuando los voltajes oscilan a nivel de la meseta del PA. Existen varios subtipos de canales de esta corriente con diferentes conductancias, el I_{Kr} ($I_{K, rapid}$) y el I_{Ks} ($I_{K, slow}$)

La $I_{K(Ca)}$ es una corriente de potasio activada por Ca^{2+} , que se activa en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} citosólico. Ayuda a la terminación del PA [401].

La I_{K1} es una corriente de rectificación de entrada. Su papel principal se relaciona con el mantenimiento del potencial de reposo. Tiene la peculiaridad de funcionar como una corriente de entrada cuando los potenciales están muy hiperpolarizados, pero es raro que esto ocurra. En condiciones normales es una corriente de salida.

La $I_{K(ATP)}$ es una corriente rectificadora de entrada de potasio sensible a los niveles de ATP citosólicos. Permanece inactiva a niveles normales de ATP pero cuando las concentraciones de ATP son menores de 0.5 mM, estos canales se activan favoreciendo el acortamiento del PA

La $I_{K(Ach)}$ es similar a la I_{K1} , pero se activa por unión de la acetilcolina (Ach) a su receptor muscarínico. Es un mecanismo importante en la modulación de las propiedades eléctricas del corazón mediante estimulación vagal.

2.3.2.4 CORRIENTES DE CLORO

Los canales selectivos de cloro dan lugar a una corriente adicional de repolarización durante la fase de meseta. Pueden activarse por quinasas, ATP y un aumento del Ca^{2+} intracelular [402-405].

2.3.2.5 CORRIENTE ACTIVADA POR HIPERPOLARIZACIÓN (I_f)

La I_f parece ser una de las corrientes implicadas en la actividad marcapasos [406]. El subíndice f proviene del inglés funny, divertido, por las inusuales características de esta corriente. No es selectiva para K^+ ya que depende de Na^+ y K^+

Es una corriente lenta de entrada, activada por hiperpolarización y presente sobre todo en células automáticas.

2.3.3 ASPECTOS GENERALES DEL REMODELADO ELÉCTRICO

Se sabe que los pacientes con hipertrofia documentada por ecocardiografía presentan un riesgo más elevado de desarrollar arritmias, lo que supone un componente importante de la mortalidad asociada con la hipertrofia cardiaca [407]. Los mecanismos implicados en el desarrollo de estas arritmias son multifactoriales, pero se deben, al menos en parte, a alteraciones en las corrientes iónicas que dan lugar a prolongaciones en los potenciales de acción ventriculares. El retraso en la recuperación de la excitabilidad que resulta de esa prolongación del potencial de acción cardiaco, que es muy frecuente en la hipertrofia [408, 409], predispone a la aparición de post potenciales tempranos y tardíos. La hipertrofia también se relaciona con fibrosis, desacoplamiento eléctrico entre células, conducción enlentecida y dispersión o refractariedad, todo lo cual predispone a la aparición de arritmias de re-entrada. Este remodelado eléctrico en su conjunto es la causa subyacente a la propensión a arritmias, síncope y muerte súbita en los pacientes hipertróficos.

Además, las alteraciones en los flujos de calcio en la célula también contribuyen a la patogénesis de la hipertrofia al activar vías de respuesta al calcio de forma anormal.

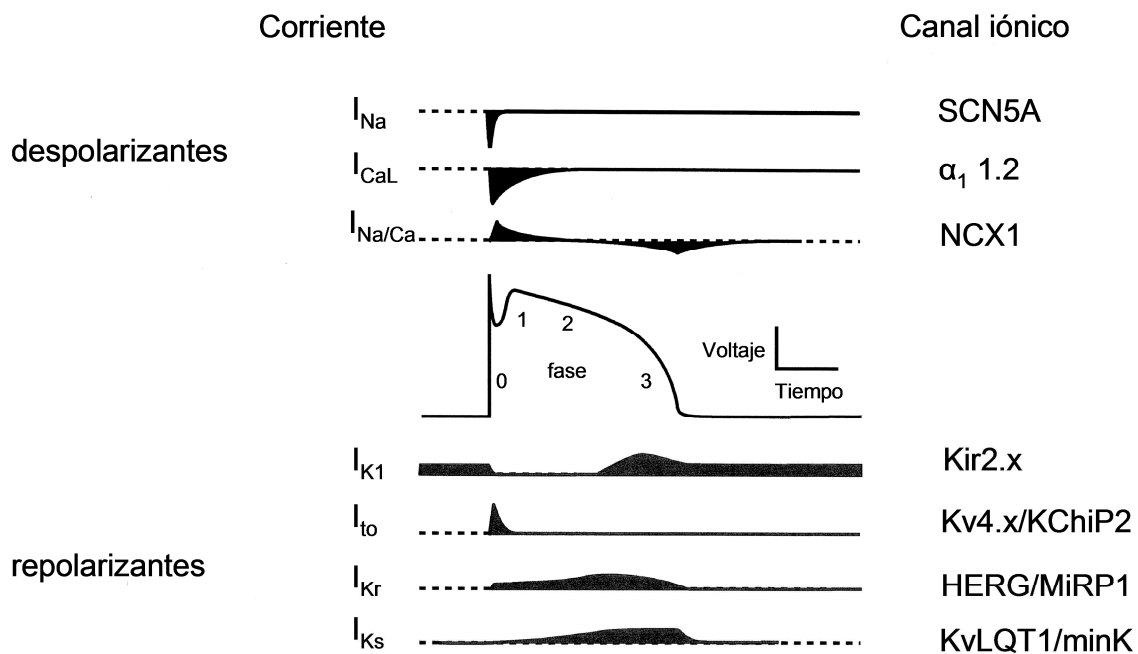


Figura 28. Corrientes implicadas en el potencial de acción cardíaco y canales que codifican estas corrientes.

Como se ha explicado previamente, las corrientes de entrada activas durante la fase de repolarización incluyen la corriente de calcio tipo L (I_{CaL}), que está activa en la fase 2 del potencial de acción y además, la corriente de entrada mediada por el intercambiador sodio/calcio (I_{NCX}), que está activa en la fase 3. La corriente de calcio tipo T normalmente no se encuentra en los miocitos ventriculares, pero se regulan al alza en algunos modelos de insuficiencia cardiaca. Las corrientes de salida del miocito ventricular son numerosas y muy complejas y son muy variables entre especies. Estas corrientes de potasio incluyen al menos dos isoformas de la corriente transitoria de salida de potasio (I_{to}), que controla la repolarización rápida de la fase 1, y establece el nivel de voltaje de la fase 2 de meseta. En la zona terminal de la fase 2 se activan las corrientes rectificadoras de potasio (I_{Kr} , I_{Ks} y a veces I_{Kur}). Durante la fase terminal de la repolarización y en la diástole, las corrientes rectificadoras de entrada de potasio I_{K1} son muy importantes.

Las características electrofisiológicas del tejido ventricular son heterogéneas a lo largo de la pared del ventrículo y esta heterogeneidad es la responsable de un gran número de procesos fisiológicos. En este remodelado adaptativo que se produce durante la hipertrofia están implicados los cardiomiocitos, elementos de la matriz extracelular, fibroblastos y la vasculatura coronaria. La

mayor parte de estas respuestas adaptativas son beneficiosas a corto plazo, pero a largo plazo se convierten en maladaptativas, dando lugar a una descompensación progresiva.

2.3.4 CAMBIOS EN LA DURACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN

Tanto en la hipertrofia cardiaca como en la insuficiencia se observa muy frecuentemente un aumento en la duración del potencial de acción, al contrario de lo que ocurre en la fibrilación auricular. En enfermedades como la insuficiencia cardiaca se produce una disminución de las corrientes de salida de iones dando lugar a una prolongación en la duración del potencial de acción. De esta forma, en un gran número de modelos de insuficiencia cardiaca se observa una disminución de las corrientes repolarizantes, especialmente en la I_{to} , secundaria a una disminución de la expresión de las subunidades del canal de potasio que codifican para esta corriente (Kv4.2 y Kv4.3) [408, 410]. De hecho, entre las corrientes de potasio activas en el corazón, una disminución de la densidad de la I_{to} es el cambio más observado en la insuficiencia cardiaca. Se sabe poco de los mecanismos de regulación de esta corriente en la patología, aunque generalmente la disminución de la densidad de corriente se correlaciona con menor expresión de los niveles transcripcionales del canal que la codifica. Por el contrario, en la hipertrofia cardiaca, el aumento de la duración del potencial de acción más frecuentemente depende de un aumento de las corrientes de entrada de calcio, particularmente en modelos en los que no se produce una hipertrofia muy marcada. De hecho se ha sugerido que la densidad de los canales de calcio tipo L correlaciona de forma inversa con la gravedad de la hipertrofia o de la disfunción ventricular, así en modelos de hipertrofia leve a moderada la I_{CaL} se encuentra frecuentemente aumentada, mientras que en modelos de hipertrofia grave o insuficiencia la I_{CaL} no se modifica frente a los niveles control o se encuentra disminuida [408].

2.3.5 CAMBIOS EN LAS CORRIENTES DE CALCIO

En la hipertrofia cardiaca se producen alteraciones en el metabolismo del calcio que conducen a un desajuste en la contracción y la transcripción génica. Los transitorios de calcio aumentan en la hipertrofia [411] así como la corriente de entrada de calcio I_{CaL} [408, 412, 413]. Sin embargo, en la insuficiencia cardiaca los mecanismos que se alteran en la regulación del calcio intracelular son diferentes a los de la hipertrofia cardiaca. En este caso las concentraciones de calcio intracelular disminuyen dando lugar a una función contráctil disminuida. Además, los niveles de calcio

diastólicos suelen estar aumentados en el corazón insuficiente, dando lugar a una disfunción diastólica. Los mecanismos que subyacen a estas alteraciones en la homeostasis del calcio implican fallos en la regulación de la SERCA, del receptor de la rianodina y alteraciones en la recaptación del calcio por el retículo debidas a la menor expresión de la SERCA y a alteraciones en la fosforilación del fosfolambano, el principal regulador de la actividad de la SERCA [414]. Pero en los dos casos, las alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular contribuyen a la activación de quinasas y fosfatasa, entre las que se encuentran las MAPK, la PKC y la calcineurina [415]. Todos estos cambios dan lugar a modificaciones en la regulación génica, que contribuyen a la progresión de la enfermedad.

2.3.6 INTERCAMBIADOR SODIO-CALCIO

El intercambiador sodio-calcio (NCX) es uno de los principales mecanismos de eliminación del calcio durante la diástole, cataliza el intercambio bidireccional de tres iones sodio por un ion calcio, por lo tanto, en cada ciclo se mueve hacia el interior una carga neta positiva de forma que se genera una corriente transmembrana de una magnitud aproximadamente igual a la mitad de la corriente de calcio tipo L. La expresión del NCX es máxima en el neonato y disminuye con el tiempo [416]. En varios modelos de insuficiencia cardiaca, los niveles de expresión proteica y la actividad del NCX se encuentran incrementados [417]. Se ha propuesto que este puede ser un mecanismo adaptativo para preservar el metabolismo del calcio y aumentar la función cardiaca y la lusitropía. Pero por otro lado, un incremento del NCX cardiaco puede dar lugar a una depleción de las reservas de calcio intracelular [418] y comprometer la función sistólica [419] y dar lugar a arritmogénesis [420-422]. En modelos de hipertrofia cardiaca compensada, sin disfunción sistólica o insuficiencia cardiaca, la expresión proteica de NCX también se ha visto aumentada, de forma similar a lo observado durante la insuficiencia cardiaca [423].

2.3.7 REMODELADO DE LOS CANALES DE POTASIO

En varios modelos de hipertrofia cardiaca se ha observado que el remodelado eléctrico que se produce con más frecuencia es una prolongación de la duración del potencial de acción [424-426] y esta alteración se debe a modificaciones en las corrientes de potasio.

En roedores, se ha observado que en la mayor parte de los modelos de hipertrofia cardiaca, la I_{to} se encuentra disminuida. La I_{to} está constituida por un componente rápido en la que la recuperación de la inactivación es rápida (I_{tof} o I_{to1}) y un componente lento en la que la recuperación es lenta (I_{tos} o I_{to2}) [427]. La subunidad α de la I_{tof} está codificada en roedores por las subunidades Kv4.2 y Kv4.3 y el Kv1.4 codifica la subunidad α de la I_{tos} [428].

Por su parte el KCHIP2 es una subunidad auxiliar del canal de potasio que se une al extremo N terminal de las subunidades Kv4.2 y Kv4.3 y que parece tener una función dual. El KCHIP2 se requiere para el transporte de los canales Kv4.2 y Kv4.3 del retículo sarcoplásmico a la membrana plasmática y también regula la cinética del canal, acelerando la recuperación de la inactivación de la I_{tof} [428, 429].

En el remodelado eléctrico asociado a la hipertrofia, la I_{tof} es la que se modifica más frecuentemente, pero sin cambios en la dependencia del voltaje de la activación en el estado estacionario, ni de la inactivación, sugiriendo estos datos, que el principal cambio inducido por la hipertrofia es una disminución en el número de canales que codifican para la I_{to} . Asimismo, se ha observado una disminución en los niveles de ARNm para las subunidades α (Kv4.2 y Kv4.3) y β (KCHIP2) de la I_{tof} , que son consistentes con los cambios observados en la corriente [429].

Además de las alteraciones en la I_{tof} , en la hipertrofia cardiaca se han observado modificaciones en otros canales de potasio como el Kv1.5 [430-432] generalmente relacionadas con la hipertrofia asociada a la actividad de la hormona tiroidea.

ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN CONTRACCIÓN CARDIACO

3. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN CARDIACO

El acoplamiento excitación-contracción es el proceso que une la excitación eléctrica del miocito con la contracción cardíaca, dando lugar a un bombeo de sangre. El calcio es un segundo mensajero ubicuo esencial en la actividad eléctrica cardíaca y es el activador directo de los miofilamentos.

Actualmente, el mecanismo de acoplamiento excitación-contracción propuesto por Fabiato [433, 434] es un mecanismo ampliamente aceptado. Según estos trabajos, la onda de despolarización durante el PA está acoplada a la contracción por un fenómeno liberado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CIRC de sus siglas en inglés Calcium-Induced Calcium release).

Los acontecimientos que tendrían lugar se inician con la entrada de Ca^{2+} a través de sus canales, localizados en los túbulos T, durante la fase 2 del PA. Aunque la cantidad de Ca^{2+} que entra a través de estos canales no es suficiente para inducir la contracción de la célula, este Ca^{2+} activa la liberación de más Ca^{2+} por el Retículo Sarcoplásmico (RS) a través de los canales de rianodina (RyR). La cantidad de Ca^{2+} liberada por el Retículo es suficiente para producir un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) que se unirá a troponina C y activará la maquinaria contráctil.

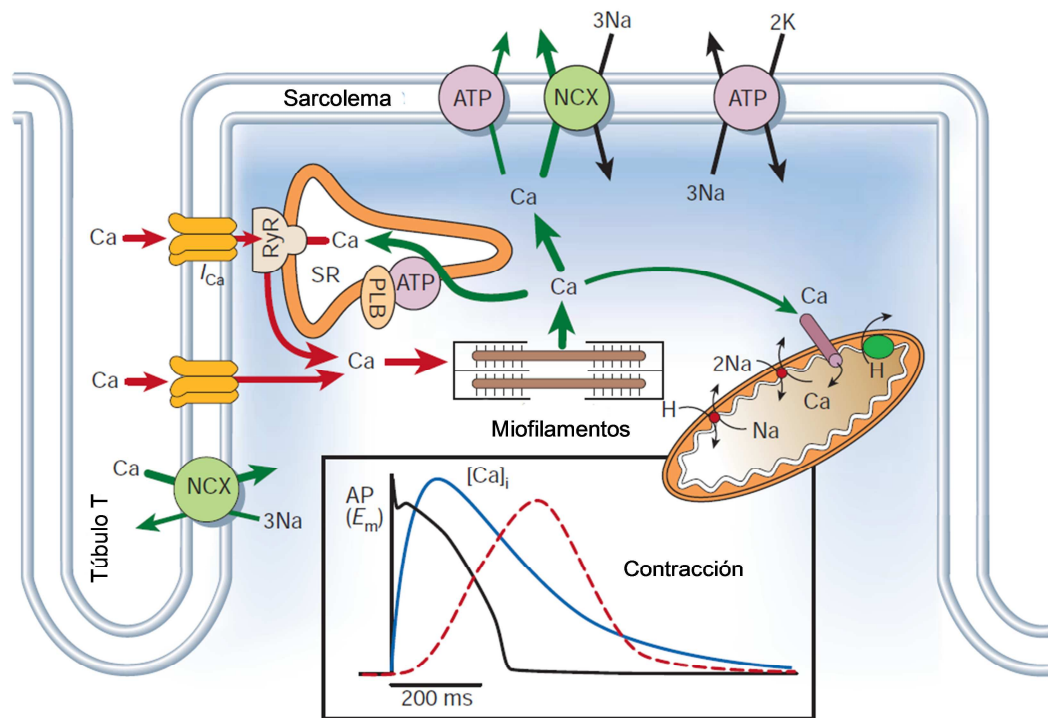


Figura 29. Mecanismo de acoplamiento excitación-contracción cardíaco (Modificado de Bers DM, 2002)

3.1 CONTROL LOCAL DEL Ca^{2+}

Stern en 1992 [435] propuso por primera vez, mediante cálculos teóricos, que el RS no se activaba por el aumento global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puesto que esto supondría una gran sensibilidad de los RyRs, ya que pequeñas variaciones de este ion inducían la activación total de los RyR. En su teoría, Stern proponía que el RS se activaba por el aumento local de Ca^{2+} que tenía lugar en el espacio restringido entre los canales de Ca^{2+} tipo L y los RyRs.

Esta teoría se confirmó con el hallazgo de que la apertura de un canal de Ca^{2+} tipo L se correspondía con la apertura de uno o varios RyR, que liberaban Ca^{2+} en forma de sparks (destellos o unidades básicas de liberación de Ca^{2+} por el RyR) [436, 437].

Que el control del Ca^{2+} sea local implica que los RyR son relativamente insensibles al Ca^{2+} y solo altas concentraciones de calcio intracelular producidas en la cercanía del canal de Ca^{2+} tipo L activan la liberación de Ca^{2+} del RS [438]. Como el Ca^{2+} difunde rápidamente, es lógico pensar que la distancia física del canal de calcio tipo L y el RS es pequeña [438]. Por tanto, en esta teoría es de

extrema importancia la proximidad anatómica entre el canal de Ca^{2+} y el de RyR y se postula que cuando se abre un canal de Ca^{2+} tipo L, el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ local activa un pequeño grupo (cluster) de RyR produciendo un spark de Ca^{2+} [439, 440].

Aunque el número de canales de rianodina que se abren simultáneamente para dar lugar a un spark no se conoce, parece claro que el transitorio global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se puede explicar cómo el sumatorio espacial y temporal de los sparks de Ca^{2+} liberados de forma local [439].

Los sparks son pequeñas cantidades de Ca^{2+} que se liberan de forma espontánea y local, del RS incluso en ausencia de I_{CaL} [441]. También se les denomina unidades elementales de la liberación del RS y su capacidad de difusión es tan pequeña que no pueden disparar la contracción por sí solos. Sin embargo, durante el acoplamiento excitación-contracción se liberan de forma sincronizada un gran número de sparks que dan lugar al transitorio que sí dará lugar a la contracción.

3.2 ACTIVACIÓN DEL RS

3.2.1 CORRIENTE DE Ca^{2+} TIPO L (I_{CaL})

Como se ha explicado previamente, una despolarización de la membrana induce la activación de la corriente, pero la cantidad de Ca^{2+} que entra al citosol está limitada por la inactivación dependiente de Ca^{2+} mediada por calmodulina [442, 443] y por el propio Ca^{2+} liberado del RS [444, 445]. Por tanto, la liberación de Ca^{2+} del RS y la I_{CaL} generan mecanismos de retroalimentación negativa en la entrada de Ca^{2+} . De hecho, la entrada total de Ca^{2+} a través de la I_{CaL} se reduce, aproximadamente, un 50% cuando comienza la liberación de Ca^{2+} del RS [446]. En la insuficiencia cardiaca, la liberación del RS se encuentra disminuida y se ha observado que la inactivación de I_{CaL} dependiente del Ca^{2+} es menor, ayudando a la prolongación del PA [447]. También se ha observado una inactivación dependiente del calcio más lenta cuando la frecuencia de estimulación aumenta, fenómeno que se conoce como facilitación y que es dependiente del Ca^{2+} liberado por el RS [448, 449]. Si las estimulaciones son demasiado seguidas, el RS no tiene tiempo de cargarse y el transitorio global de Ca^{2+} disminuye [448]. El resultado será una mayor entrada de Ca^{2+} por el canal de calcio tipo L.

3.2.2 OTRAS VÍAS

Además de a través del canal de calcio tipo L, el Ca^{2+} puede fluir al citosol a través del NCX que incorpora al interior celular un ion Ca^{2+} y saca 3 iones Na^+ cuando el potencial se hace positivo, en un proceso de funcionamiento en modo reverso [450-452], sin embargo, cuando esta corriente coexiste con la I_{CaL} es mucho menos efectiva y más lenta que la I_{CaL} en el disparo del proceso de acoplamiento excitación-contracción [453]. Una acumulación de iones Na^+ en la hendidura diádica o fuzzy zone también puede dar lugar a un funcionamiento en modo reverso del NCX [454-456]. Sin embargo, otros autores rechazan esta hipótesis al sostener que los canales de Na^+ no están próximos a la hendidura diádica [445].

Esta vía no tiene importancia en situaciones fisiológicas, debido a la primacía de la I_{CaL} , sin embargo, parece adquirirla cuando la concentración de Na^+ es muy elevada en el interior de la célula, cuando la I_{CaL} está disminuida o cuando se sobreexpresa el NCX.

El canal de calcio tipo T también podría contribuir al acoplamiento excitación-contracción [457, 458]. Sin embargo no es funcional en la mayoría de las células ventriculares cardiacas y en las zonas donde se encuentra (células de Purkinje) su capacidad para activar los canales de rianodina es pequeña al no situarse cerca de las hendiduras diádicas, por lo que son colaboradores secundarios del acoplamiento excitación-contracción [459].

Pero, además de la entrada de Ca^{2+} , se ha propuesto que el proceso de contracción se puede desencadenar como consecuencia de variaciones del potencial de membrana que activan los canales de RyR sin necesidad de un influjo de Ca^{2+} [460, 461].

3.3 PAPEL DEL RS EN EL ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN

Los componentes fundamentales para la liberación del Ca^{2+} del retículo son los canales de rianodina. La liberación de Ca^{2+} en forma de sparks de Ca^{2+} depende de lo cargado que se encuentre el retículo, así, si la carga es elevada aumenta la cantidad de Ca^{2+} disponible para la liberación y la fracción de Ca^{2+} liberada por cada disparo inducido por la I_{CaL} [462]. Esto se debe a que el propio Ca^{2+} del interior del retículo aumenta la probabilidad de apertura del RyR [463] e induce la liberación espontánea de Ca^{2+} . Sin embargo, si la carga de Ca^{2+} del RS es baja, la I_{CaL} puede fallar

en la activación del retículo [462], permitiendo así la recarga del mismo al fluir más tiempo el Ca^{2+} , tanto a través de canales de Ca^{2+} tipo L como a través del NCX.

3.4 EL Ca^{2+} DESPUÉS DE LA CONTRACCIÓN

Una vez finalizado el proceso contráctil, todo el calcio que se ha movilizado en el interior celular debe retornar a su lugar de origen, para lo cual la célula tiene varios mecanismos tanto a nivel de la membrana plasmática como en el retículo.

En la membrana, el NCX se encarga de sacar el Ca^{2+} al exterior (saca un ion Ca^{2+} y mete al interior celular 3 Na^+), pero también hay una pequeña contribución de la bomba de calcio del retículo (SERCA) que incorpora el calcio al retículo de nuevo.

En general se acepta que la cantidad de Ca^{2+} que sale por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es equivalente a la que entró por el canal de calcio tipo L y la cantidad de Ca^{2+} transportada por la SERCA es similar a la liberada por el RS. De esta forma se conserva la cantidad total de Ca^{2+} en la célula.

Existen varias isoformas de la SERCA pero en el corazón predomina la de tipo 2 [464]. Constituye aproximadamente el 40% de la proteína del RS y es uno de los mecanismos más importantes para reducir el Ca^{2+} citosólico e iniciar la diástole. Por cada molécula de ATP que se hidroliza se acumulan dos iones Ca^{2+} en el retículo.

El fosfolambano es un péptido que forma parte de la membrana del RS y se localiza junto a la SERCA inhibiéndola [465]. Cuando se produce un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ o por estimulación adrenérgica, el fosfolambano se fosforila y se disocia de la SERCA, permitiendo su actividad y acelerando la recaptación del Ca^{2+} al RS. El fosfolambano se fosforila en tres sitios diferentes y de forma específica por CaMKII en la Treonina 17, por PKA en la Serina 16 y por PKC en la Serina 10 [466].

Además, existe una autorregulación por el propio Ca^{2+} . La calmodulina es crítica en este sistema, en el que actúa como sensor intracelular de Ca^{2+} [467]. La calmodulina es una cadena polipeptídica con cuatro dominios específicos para la unión a Ca^{2+} . Cuando no hay Ca^{2+} en el medio, los cuatro dominios están ocupados por Mg^{2+} , pero cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta, el Mg^{2+} es desplazado por el Ca^{2+} de tres de los sitios de unión. La forma activa Ca_3Mg -calmodulina aumenta la actividad de las

bombas del RS y de la membrana cuando $[Ca^{2+}]_i$ es alta. Además, inhibe la liberación de Ca^{2+} por los canales de rianodina al reducir su tiempo de apertura [468].

3.5 HOMEOSTASIS DEL CALCIO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

La contractilidad cardíaca viene determinada por la amplitud y cinética del ciclo del calcio, que se regula por fosforilaciones y defosforilaciones de las proteínas previamente citadas. Distintas señales de estrés, como las que se producen durante la insuficiencia cardíaca, activan proteínas G acopladas a receptores β -adrenérgicos que activan la adenilato ciclasa que finalmente da lugar a AMPc y a la activación de la PKA. La PKA fosforila un gran número de las proteínas implicadas en la contracción del músculo, como el canal de calcio tipo L, los RyR y el fosfolambano [469]. En general, se acepta que fallos en la homeostasis del calcio dan lugar a RyR capaces de liberar más eventos espontáneos de calcio, que a su vez dan lugar a la salida de calcio del retículo sarcoplásmico durante la diástole y una disminución del contenido de calcio del retículo que tendrá como consecuencia una disminución de los transitorios de calcio [470-475]. Además, la actividad de la SERCA también se encuentra reducida debido a una menor expresión proteica de la misma y a una mayor inhibición por parte del fosfolambano [476]. En conjunto, estas alteraciones dan lugar a una depleción de la carga de calcio del retículo que tiene como consecuencia una contractilidad cardíaca disminuida.

Se ha establecido que la reducción de la amplitud de los transitorios de calcio, el incremento de su duración y de la constante de caída de los mismos empeoran la situación patológica en la insuficiencia cardíaca. También se ha postulado que una reducción de la carga de calcio del retículo puede dar lugar a una disminución en la amplitud del transitorio y de esta forma provocar una disminución de la contractilidad cardíaca [477]. En este sentido, una disminución de la función de la SERCA y un incremento del NCX se han propuesto como posibles causas de la disminución de la carga del retículo que ocurre durante la insuficiencia cardíaca [478].

Por otro lado, se ha descrito que en algunos modelos de insuficiencia cardíaca se produce una hiperfosforilación de la RyR en el sitio específico de la PKA que da lugar a la desestabilización del canal en el estado cerrado y una salida de calcio del retículo en diástole que da lugar a la reducción

del transitorio de calcio que a su vez tiene como consecuencia una disminución de la contractilidad cardíaca y un aumento de la aparición de arritmias [479, 480].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La leptina es una adipocitoquina cuya principal función es la regulación a nivel central de la ingesta y del gasto energético [4, 40] y cuyos niveles se encuentran elevados con frecuencia en la obesidad [164]. Inicialmente se pensaba que la expresión y la secreción de leptina se limitaba al tejido adiposo, sin embargo, actualmente se acepta que puede ser secretada por otros tejidos, incluyendo el corazón, donde puede ejercer efectos autocrinos y paracrinos [28, 481]. Además, en el corazón se expresan las isoformas a y b del receptor de leptina (OB-Ra y OB-Rb), lo que sugiere que leptina puede tener efectos cardíacos directos [7].

Existe una amplia evidencia de los efectos pro-hipertróficos de leptina en cardiomiocitos neonatales y pediátricos [87-90], sin embargo, hasta la fecha no existen datos relativos al efecto pro-hipertrófico de leptina en miocitos adultos.

Por otra parte, hasta la fecha de la realización de la presente tesis doctoral, no existían datos en relación a los efectos de leptina en el remodelado iónico o las alteraciones de la homeostasis del calcio que frecuentemente se asocian con la patología cardíaca [470, 471, 473-476, 482, 483].

Además, se han realizado un gran número de estudios que analizan la asociación entre los niveles circulantes de leptina y la enfermedad cardiovascular. Recientemente se ha propuesto que los niveles de leptina plasmáticos se correlacionan de forma significativa con la insuficiencia cardíaca en ausencia de una enfermedad coronaria establecida [168]. Por otro lado, a nivel celular leptina puede ejercer numerosos efectos pleiotrópicos en el miocardio, de tal forma que se ha implicado en el remodelado cardíaco a distintos niveles [175] siendo capaz de activar vías proinflamatorias o de inhibir la apoptosis de los miocitos cardíacos en determinadas circunstancias.

Con estos antecedentes, nuestra hipótesis es que leptina puede tener un efecto pro-hipertrófico en los cardiomiocitos ventriculares adultos y que esta hipertrofia puede acompañarse de un remodelado iónico. Además, proponemos que leptina puede tener un papel importante en el desarrollo de la patología cardíaca. Por lo tanto, los objetivos de la presente tesis doctoral son:

Objetivos

1. Estudiar el efecto pro-hipertrófico de leptina en cardiomiocitos ventriculares adultos y las vías de señalización intracelular implicadas en ese efecto.
2. Estudiar el efecto de leptina sobre el remodelado eléctrico en cardiomiocitos ventriculares adultos y analizar las vías que pueden participar en ese efecto.
3. Caracterizar los efectos del tratamiento crónico con leptina sobre la función cardíaca, estudiando *ex vivo*, el proceso de acoplamiento excitación-contracción en cardiomiocitos ventriculares adultos y las proteínas implicadas en el mismo.
4. Analizar las posibles vías implicadas en los efectos de leptina sobre la contractilidad cardíaca.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las guías de cuidado animal de la Unión Europea (European Communities Council ,86/609/EEC) y conforme a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por el U.S. National Institute of Health (NIH Publication N°. 85-23, revisado en 1996). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

1.1 TRATAMIENTO CON LEPTINA IN VITRO

Para el estudio in vitro, se obtuvieron cardiomiocitos ventriculares de ratas Wistar macho adultas de un peso comprendido entre 150 y 300 gramos.

Para cada experimento se utilizaron los corazones de dos ratas. Una vez obtenidas las células se almacenaron conjuntamente en solución de conservación (store) y a continuación se dividieron en los diferentes grupos experimentales. Para el análisis de las vías de señalización implicadas en los efectos de leptina, las células se incubaron a tiempos cortos de entre 15 y 60 minutos siguiendo el esquema que se muestra a continuación:

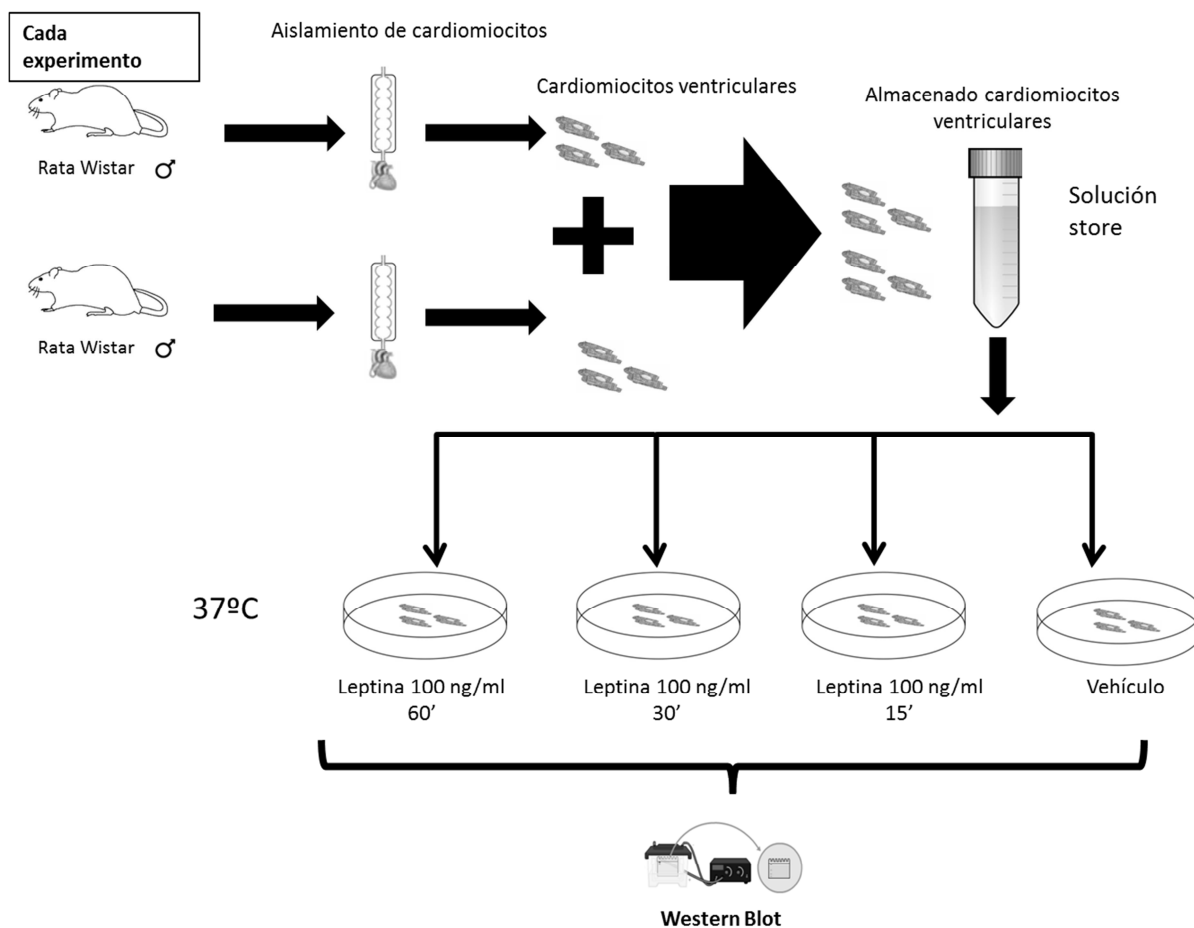


Figura 30. Diseño experimental. Las células obtenidas de los corazones de dos ratas se almacenaron en solución de store y después se dividieron en cuatro grupos. Uno se trató con el vehículo y el resto con leptina a una concentración de 100 ng/ml durante 15', 30' ó 60'. A continuación las células se recogieron para realizar Western blot

Una vez determinado el pico de activación de las diferentes vías analizadas, las células se pre-incubaron con los inhibidores selectivos de cada una de ellas (tricitribina inhibidor de Akt; PD-98059 inhibidor de ERK y Rapamicina inhibidor de m-TOR) y tras una incubación con leptina 100 ng/ml durante el tiempo necesario para alcanzar la actividad máxima, los miocitos se recogieron para analizar el efecto de los inhibidores sobre sus respectivas vías diana:

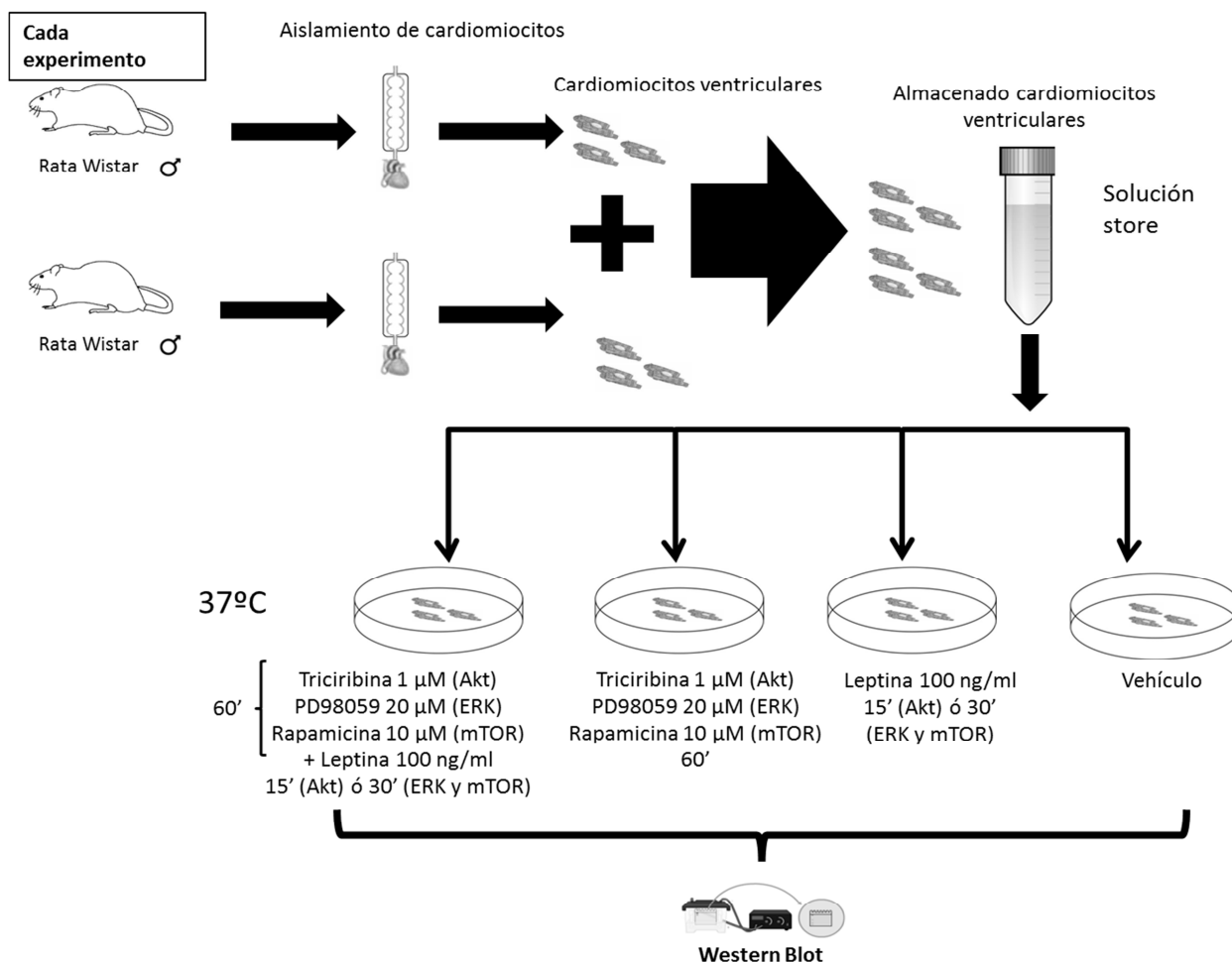


Figura 31. Diseño experimental. Las células obtenidas de los corazones de dos ratas se almacenaron en solución de store y después se dividieron en cuatro grupos. Uno se trató con el vehículo, otro con leptina a una concentración de 100 ng/ml otro grupo se trató con el inhibidor correspondiente y otro se pre-trató con el inhibidor y posteriormente se trató con leptina durante los tiempos indicados. Las células se recogieron para realizar Western blot

Finalmente, para analizar la hipertrofia y el remodelado de los canales iónicos voltaje-dependientes inducidos por leptina, las células se trataron siguiendo el esquema que se detalla a continuación:

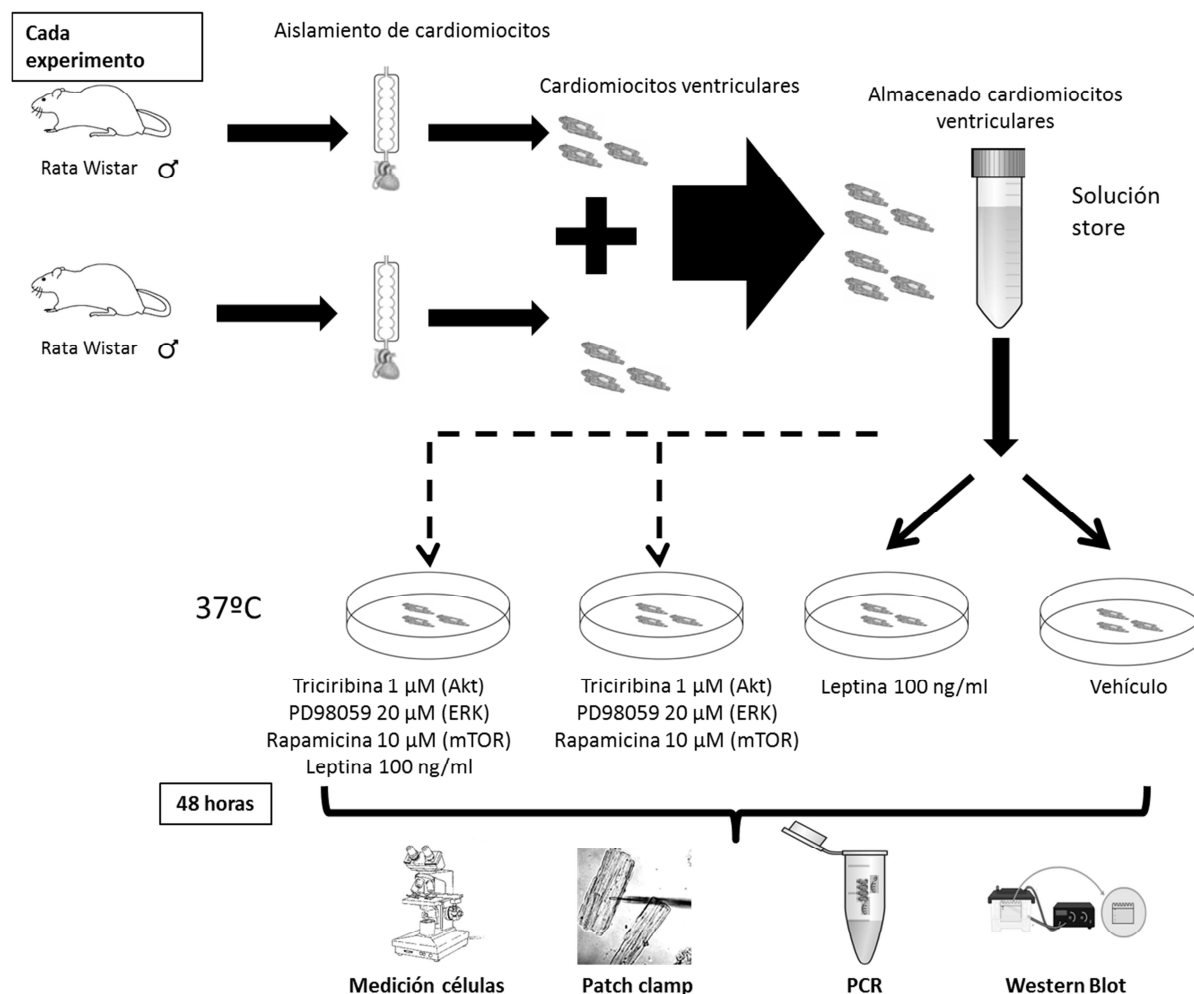


Figura 32. Diseño experimental. Las células obtenidas de los corazones de dos ratas se almacenaron en solución de store y después se dividieron en cuatro grupos. Uno se trató con el vehículo, otro con leptina a una concentración de 100 ng/ml otro grupo se trató con el inhibidor correspondiente y otro se pre-trató con el inhibidor 1 hora y posteriormente se trató con leptina durante 48 horas. Las células se recogieron para analizar el tamaño, para los experimentos de patch clamp y para realizar PCR y Western blot

1.2 TRATAMIENTO CON LEPTINA IN VIVO

Para los estudios de los efectos del tratamiento *in vivo* de leptina sobre la función cardiaca, se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL6J de 8 semanas de edad. Los ratones se trataron con leptina durante 3 semanas con una dosis de 0.36 mg/kg/día. El tratamiento se realizó mediante la implantación de bombas osmóticas de liberación sostenida, modelo 2004 (ALZET®) con una velocidad de liberación de 0.25 µl/hora. Tras el sacrificio del animal, se aislaron cardiomiocitos ventriculares en los que se estudió la corriente de calcio tipo L (I_{CaL}) mediante la técnica de patch-clamp en su configuración de célula entera, la homeostasis de calcio intracelular mediante la microscopía confocal y el análisis de la actividad y expresión de las diversas proteínas implicadas en el manejo del calcio intracelular (RyR, NCX, PLB) mediante la

técnica de Western blot. Además, se analizó mediante ELISA la concentración de leptina en los cardiomiocitos procedentes de animales controles y tratados con leptina

El esquema experimental utilizado fue el que se detalla a continuación:

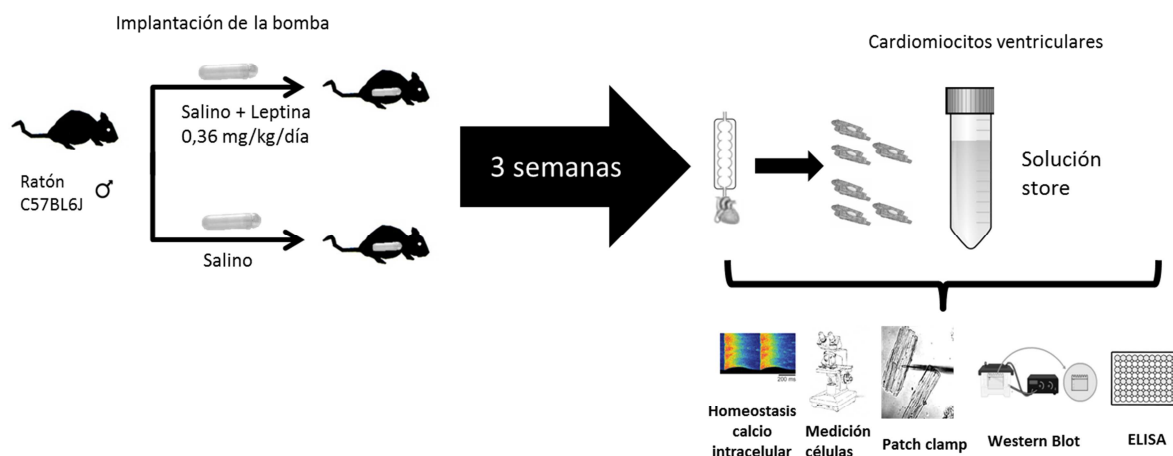


Figura 33. Diseño experimental. Los animales se trataron durante tres semanas con solución salina o con leptina. Pasado este tiempo se aislaron los cardiomiocitos de estos animales y las células se recogieron para analizar el tamaño, para los experimentos de patch clamp y microscopía confocal y para realizar Western blot y ELISA.

2. MÉTODO DE AISLAMIENTO DE MIOCITOS VENTRICULARES

En los estudios *in vitro*, los miocitos ventriculares fueron aislados de corazones de ratas Wistar, macho (150-300 g de peso)

Las ratas Wistar se heparinizaron (4U.I./g i.p) para evitar la posible formación de trombos y posteriormente se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.) al que se añadió analgesia (buprenorfina, 0.05 mg/kg, i.p). Se comprobó que la rata estaba convenientemente anestesiada mediante la determinación de la pérdida del reflejo podal. A continuación se extrajeron los corazones y se montaron en un sistema Langendorff de perfusión. La aorta ascendente se canuló y se realizó una perfusión retrógrada.

Los corazones se perfundieron durante 2-3 minutos a 36-37 °C con una solución estándar de Tyrode (Ver tabla 4) libre de calcio que contenía 0.2 mM de EGTA (la eliminación del calcio en esta fase facilita posteriormente la disociación enzimática). A continuación, durante 3-4 minutos aproximadamente con la misma solución de Tyrode con 251 U.I/ml de colagenasa tipo II (Worthington) y una concentración 0.1 mM de CaCl_2 . Al finalizar la perfusión, los corazones se quitaron del sistema Langendorff y el ventrículo izquierdo (VI) incluido el septum, se cortó en pedazos pequeños y se agitó durante 3 minutos en una solución estándar de Tyrode que contenía 0.1 mM de CaCl_2 , para dispersar las células. Esta fase de readaptación al calcio es muy importante, ya que solo se utilizarán para electrofisiología aquellas células tolerantes al mismo. Además, la viabilidad de los cardiomiocitos depende en gran medida de la adaptación o no a este catión.

La suspensión de células resultante se filtró a través de una malla de nylon y a continuación se centrifugó 3 minutos a 20 g. El pellet se resuspendió en una solución estándar de Tyrode que contenía 0.5 mM de CaCl_2 . Finalmente, las células se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en una solución de Store que contenía 1mM de CaCl_2 .

En los estudios en animales tratados, los miocitos ventriculares se aislaron de corazones de los ratones de la cepa C57BL6J de 11 semanas de edad en el momento del sacrificio

Los ratones se heparinizaron (4U.I./g i.p) y anestesaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.) con analgesia (buprenorfina, 0.05 mg/kg, i.p). Se comprobó que los ratones estaban convenientemente anestesiados mediante la determinación de la pérdida del reflejo podal. A continuación se extrajeron los corazones y la aorta ascendente se canuló bajo lupa. La cánula utilizada se rellenó previamente con solución Tyrode estándar. Posteriormente se montaron en un sistema Langendorff, en el que se llevó a cabo una perfusión retrógrada a través de la aorta.

Los corazones se perfundieron durante 1-2 minutos a 36-37 °C con una solución estándar de Tyrode libre de calcio que contenía 0.2 mM de EGTA, y a continuación, durante 2-3 minutos aproximadamente con la misma solución de Tyrode con 251 U.I/ml de colagenasa tipo II (Worthington) y una concentración 0.1 mM de CaCl_2 . Al finalizar la perfusión, los corazones se quitaron del sistema Langendorff y el ventrículo izquierdo (VI) incluido el septum, se cortó en pedazos pequeños y se agitó durante 3 minutos en una solución estándar de Tyrode que contenía 0.1 mM de CaCl_2 , para dispersar las células.

La suspensión de células resultante se filtró a través de una malla de nylon y a continuación se centrifugó 3 minutos a 20. El pellet se resuspendió en una solución estándar de Tyrode que contenía 0.5 mM de CaCl_2 . Finalmente, las células se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en una solución de Store que contenía 1mM de CaCl_2 .

SOLUCIÓN TYRODE	
COMPUESTO	CONCENTRACIÓN mM
NaCl	130
KCl	5,4
NaH_2PO_4	0,4
MgCl_2	0,5
HEPES	25
NaHCO_3	5
Glucosa	22
pH= 7,4 (NaOH)	

Tabla 4. Composición de la solución de Tyrode

3. ESTUDIOS DE ELECTROFISIOLOGÍA: TÉCNICA DE PATCH-CLAMP

La técnica del parche de membrana o técnica de Patch Clamp permite estudiar las propiedades de los canales iónicos cardiacos voltaje-dependientes que intervienen en el potencial de acción cardiaco. El fundamento de esta técnica es que las células tienen capacidad conductora cuando se producen variaciones en el potencial de membrana debido a que los canales iónicos dependientes del voltaje se activan. Así, cuando una célula recibe un estímulo eléctrico puede conducir la corriente al abrirse los canales iónicos presentes en la membrana de la célula.

Según la ley de Ohm, la intensidad de una corriente que fluye a través de un circuito eléctrico es directamente proporcional al voltaje aplicado e inversamente proporcional a la resistencia que opone el medio al paso de dicha corriente, si se fija un voltaje, se puede medir la corriente iónica

que fluye a dicho potencial (Voltage-Clamp) o si se fija un valor de corriente, se puede medir la variación del voltaje para estudiar los potenciales de acción (Current-Clamp)

Se realizaron registros convencionales en la configuración de célula entera. En esta configuración, se forma en primer lugar un sello de alta resistencia entre la pipeta y la membrana. A continuación, se realiza una suave succión que abre un orificio que pone en contacto el medio intracelular con el interior de la pipeta. Así se pueden estudiar las corrientes de toda la superficie celular. Por tanto, la corriente dependerá del número de canales de la corriente unitaria y de la probabilidad de apertura de los canales. Según la ecuación de Nernst:

$$V_x = (RT/ZF) \ln ([X]_1/[X]_2)$$

Donde V_x es la diferencia de voltaje entre el medio intracelular y el extracelular en equilibrio para un determinado ion, R es la constante general de los gases, T es la temperatura absoluta, Z es la valencia del ion y $[X]_1$ y $[X]_2$ son las concentraciones del ion en el medio intracelular y extracelular.

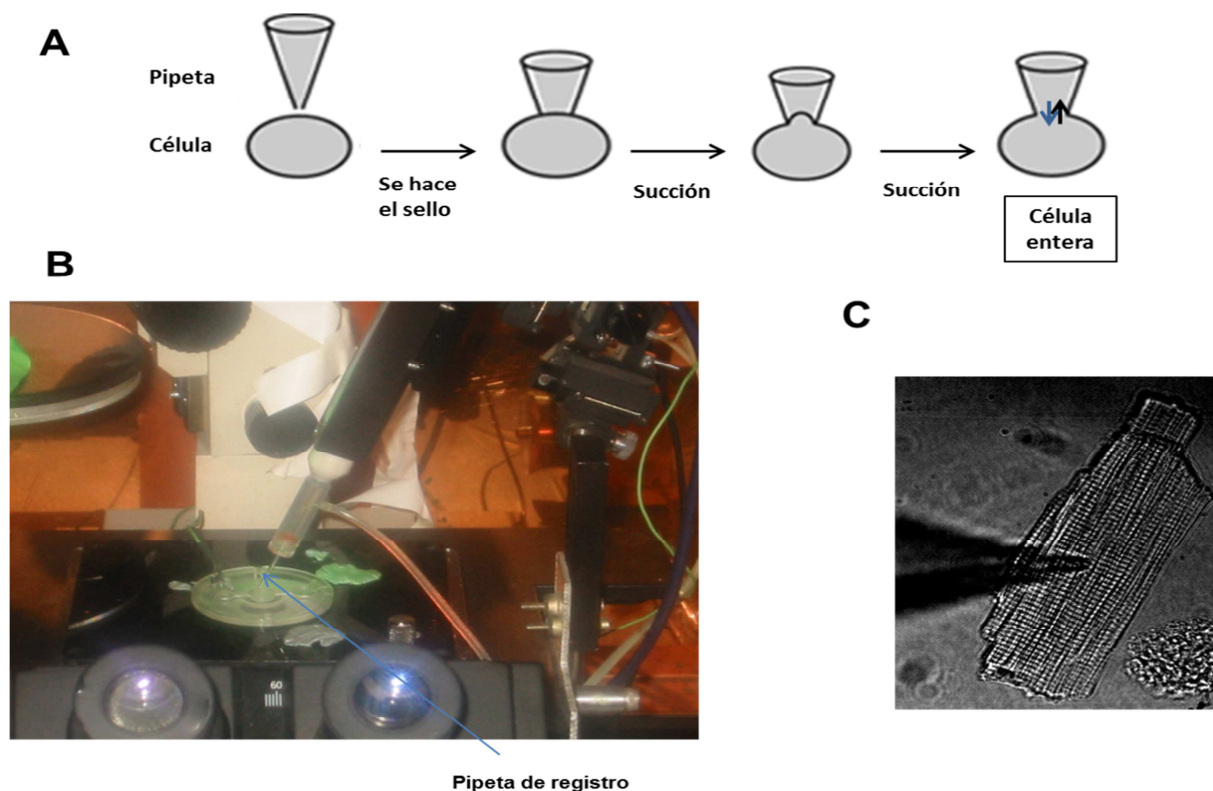


Figura 34. (A) Técnica de patch clamp en la configuración de célula entera. (B) Equipo de patch clamp. (C) Imagen de un cardiomiocito con la pipeta de registro.

3.1 TRATAMIENTO CON LEPTINA IN VITRO

Para cada experimento se usaron cardiomiocitos ventriculares de rata adulta divididos en varias fracciones según el esquema detallado previamente.

El circuito de clamp de voltaje incluía un amplificador Axopatch -200B controlado por un ordenador equipado con software pclamp (versión 6.0 Axon Instruments) y conectado con el amplificador mediante un convertidor analógico-digital (Digidata 322A Axon Instruments). Las pipetas de registro se hicieron a partir de capilares de cristal blando de 1.5 mm de diámetro externo con un estirapipetas para patch-clamp (P97/PC Sutter Instruments). Cuando se llenaron con solución interna, tenían una resistencia de punta entre 0.9 y 2 M Ω .

Los experimentos de electrofisiología se realizaron a temperatura ambiente (24-26°C) en miocitos ventriculares tolerantes al calcio. Para ello se colocó una alícuota de las células en la cámara de registro. Tras unos minutos las células se depositaron en la base de la cámara. A continuación se perfundió la cámara con la solución de registro. Después de esto, se colocó la pipeta con la solución interna en el soporte, se introdujo la pipeta con una ligera presión positiva en el líquido de perfusión y se ajustó a cero la diferencia de potencial existente entre el interior y el exterior de la pipeta. Posteriormente con un micromanipulador se aproximó la pipeta a la célula y se tocó la membrana celular con la punta de la pipeta. En el momento en el que la pipeta contacta con la membrana celular, la señal que se registra en el osciloscopio del que está provisto el equipo, se vuelve muy ruidosa. Justo entonces, se liberó la presión positiva y se ejerció una presión negativa mediante una ligera succión. De esta forma se consigue un sello perfecto de alta resistencia entre la pipeta y la membrana celular. Una vez formado, en el osciloscopio no se observa corriente en respuesta al potencial aplicado. Esto es debido a la alta resistencia del sello formado. Para obtener acceso eléctrico en esta configuración, hay que romper el sello. La ruptura del sello se obtuvo al aplicar una succión brusca, que llevó consigo la fragmentación de la porción interna de la membrana delimitada por los bordes de la pipeta. Una vez fragmentada la membrana entraron en contacto el interior celular y el interior de la pipeta.

A continuación se aplicaron los diferentes protocolos para registrar corrientes iónicas, tras dializar el interior celular con el líquido de la pipeta para conseguir que las corrientes se estabilizaran.

La I_{to} se determinó mediante el siguiente protocolo: Desde un potencial de reposo de -80 mV se aplicaron pulsos despolarizantes desde -30 a +60 mV con incrementos de 10 mV durante 500 ms. Se aplicó un prepulso de 25 ms a -40 mV para inactivar la corriente de sodio. La I_{to} sensible a 4-Aminopiridina se obtuvo mediante la substracción de las corrientes obtenidas antes y después de la aplicación de 4-Aminopiridina 3 mM.

La densidad de corriente se calculó a partir de la I_{to} sensible a 4-Aminopiridina normalizada por la capacitancia de membrana (C_m). La capacitancia de membrana (C_m) se obtuvo aplicando incrementos de ± 10 mV desde un potencial de fijación de -60 mV y según la ecuación

$$C_m = \tau_c I_o / \Delta E_m [1 - (I_\infty / I_o)]$$

Donde τ_c es la constante de tiempo de la capacitancia de membrana, I_o el valor máximo de capacitancia, ΔE_m la amplitud del incremento de voltaje y I_∞ la amplitud de la corriente en el estado estacionario.

La dependencia del voltaje de la activación se estimó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$G = I / (V_m - V_{rev})$$

$$d_\infty(V_m) = G / G_{max}$$

Donde G es la conductancia de cuerda calculada al potencial de membrana V_m ; I es la magnitud de la corriente y V_{rev} es el potencial de reversión aparente de la corriente. $d_\infty(V_m)$ es el parámetro de activación en el estado estacionario y G_{max} es el valor máximo de G . Asumiendo una distribución de Boltzmann, los datos normalizados se ajustaron a una curva no lineal para la siguiente ecuación:

$$d_\infty(V_m) = 1 / \{1 + \exp[(V_{50} - V_m) / k]\}$$

Donde V_{50} es el potencial al que la conductancia es la mitad del máximo de activación y k es la pendiente que describe el ángulo de la curva de activación.

La dependencia del voltaje de la inactivación en el estado estacionario para la I_{tof} se determinó mediante la aplicación de pulsos condicionantes de 2 segundos desde un potencial de reposo de -80 mV hasta potenciales entre los -60 mV y 0 mV seguidos de un pulso de 500 ms hasta los +40.

La corriente (I) obtenida de los diferentes pre-pulsos se normalizó por la corriente máxima obtenida (I/I_{\max}). La dependencia del voltaje de la inactivación de la I_{tof} se puede aproximar por una función de distribución de Boltzmann:

$$I/I_{\max} = \{1 + \exp[(V_{50} - V_c)/k]\}^{-1}$$

Donde V_c es el voltaje del pulso condicionante, V_{50} el potencial al que la corriente es la mitad de la corriente máxima de inactivación y k es el valor de la pendiente.

Se analizó también el curso temporal de la reactivación de la I_{tof} mediante un protocolo de doble pulso. En primer lugar se aplicó un pulso condicionante de 500 ms (I_c) desde un potencial de reposo de -80 mV hasta +60 mV que fue seguido de un pulso test (I_t) de 200 ms de duración desde un potencial de reposo de -80 mV hasta +60 mV en varios intervalos (desde 0.01 hasta 4 s). Los pulsos se aplicaron a 0.1 Hz. El pico de la corriente de cada pulso test (I_t) se normalizó por el obtenido en el pulso control (I_c) y se representó como la duración del intervalo entre los pulsos de voltaje.

Los datos de la reactivación de la I_{tof} se ajustaron a una función biexponencial con la fórmula:

$$y = A_1 e^{-1/\tau_1} + A_2 e^{-1/\tau_2}$$

Donde y es el ratio de la corriente no reactivada ($1 - I_t/I_c$) y τ_1 y τ_2 son las constantes de tiempo rápida y lenta, respectivamente.

Las soluciones de registro y de llenado de la pipeta utilizadas se detallan en las tablas 5 a 7.

La I_{CaL} se determinó mediante el siguiente protocolo: Desde un potencial de reposo de -50 mV se aplicaron pulsos despolarizantes desde -40 mV a +60 mV con incrementos de 10 mV durante 300 ms a una frecuencia de 0.2 Hz. La amplitud de I_{CaL} se midió como la diferencia entre la corriente medida al pico máximo y la corriente al final del pulso. Para comparar diferentes células, las corrientes de cada célula se expresaron como densidad de corriente, calculada como la amplitud de corriente normalizada por la capacitancia de membrana. Las soluciones utilizadas para el registro y la solución de llenado de la pipeta se detallan en las tablas 8 y 9.

La I_{K1} se determinó mediante el siguiente protocolo: Desde un potencial de reposo de -40 mV se aplicaron pulsos despolarizantes desde -120 mV a 0 mV con incrementos de 10 mV durante 800

ms. La I_{K1} se midió como la corriente sensible a Ba^{2+} . Las soluciones utilizadas para el registro y para el llenado de la pipeta se detallan en las tablas 10 y 11.

La caracterización de la **duración del potencial de acción (PA)** se llevó a cabo en la configuración de current-clamp. Los potenciales de acción se obtuvieron en intervalos de 2 segundos mediante pulsos de corriente con una amplitud 1.5 veces superior al umbral y de una duración de 3 ms. Una vez estabilizados los registros, se registraron 10 PA sucesivos. Los parámetros de los PA para cada célula analizada corresponden a la media de esos 10 registros de PA. La duración del PA se midió al 20%, 50% y al 90% de la repolarización. Las soluciones utilizadas se detallan en las tablas 12 y 13.

SOLUCIÓN DE REGISTRO I_{to}	
Compuesto	Concentración mM
NaCl	135
KCl	5,4
MgCl ₂	1
Hepes	10
Glucosa	10
CaCl ₂	1
CoCl ₂	2
pH=7,4 con NaOH	

Tabla 5. Composición de la solución de registro de I_{to} para los estudios *in vitro*

SOLUCIÓN DE REGISTRO I_{to} con 4-AP	
Compuesto	Concentración mM
NaCl	135
KCl	5,4
MgCl ₂	1
Hepes	10
Glucosa	10
CaCl ₂	1
CoCl ₂	2
4-AP	3
pH=7,4 con NaOH	

Tabla 6. Composición de la solución de registro de I_{to} con 4-AP para los estudios *in vitro*

SOLUCIÓN INTERNA I_{to}	
Compuesto	Concentración mM
EGTA	10
K aspartato	125
KCl	25
MgCl ₂	1
Hepes	5
ATPNa ₂	1
GTPNa ₂	5
4-AP	0,4
pH=7,2 con KOH	

Tabla 7. Composición de la solución de interna de I_{to} para los estudios *in vitro*

SOLUCIÓN REGISTRO I _{CaL}	
Compuesto	Concentración mM
NaCl	140
CsCl	5,4
CaCl ₂	1,8
MgCl ₂	1,1
Glucosa	10
Hepes	5
pH=7,4 con NaOH	

Tabla 8. Composición de la solución de registro de I_{CaL} para los estudios *in vitro*

SOLUCIÓN INTERNA I _{CaL}	
Compuesto	Concentración mM
EGTA	5
CsCl	100
TEA	20
Hepes	10
GTPNa ₂	0,4
ATPNa ₂	5
Fosfocreatina	5
CaCl ₂	0,06
pH=7,2 con CsOH	

Tabla 9. Composición de la solución interna de I_{CaL} para los estudios *in vitro*

SOLUCIÓN REGISTRO I _{K1}	
Compuesto	Concentración mM
NaCl	140
KCl	5,4
CaCl ₂	1,8
MgCl ₂	1
CoCl ₂	2
4-AP	3
Glucosa	10
Hepes	5
pH=7,4 con NaOH	
BaCl ₂	3

Tabla 10. Composición de la solución de registro de I_{K1} para los estudios *in vitro*

SOLUCIÓN INTERNA I _{K1}	
Compuesto	Concentración mM
EGTA	5
K aspartato	130
CaCl ₂	1
MgCl ₂	6
Hepes	10
ATPNa ₂	5
pH=7,2 con KOH	

Tabla 11. Composición de la solución interna de I_{K1} para los estudios *in vitro*

SOLUCIÓN DE REGISTRO PA	
Compuesto	Concentración mM
NaCl	140
KCl	4
MgCl ₂	1,1
Hepes	10
Glucosa	10
CaCl ₂	1,8
pH=7,4 con NaOH	

Tabla 12. Composición de la solución de registro de PA para los estudios *in vitro*

SOLUCIÓN INTERNA PA	
Compuesto	Concentración mM
KCl	125
EGTA	5
MgCl ₂	4
Hepes	10
Glucosa	10
Na ₂ ATP	5
Na ₂ Fosfocreatina	5
pH=7,4 con NaOH	

Tabla 13. Composición de la solución de interna de PA para los estudios *in vitro*

3.2 TRATAMIENTO CON LEPTINA IN VIVO

Para cada experimento, se usaron cardiomiocitos ventriculares de ratón. Los experimentos de electrofisiología se realizaron a temperatura ambiente (24-26°C) en miocitos ventriculares tolerantes al calcio. La corriente de calcio tipo L (I_{CaL}) se determinó mediante el siguiente protocolo:

Desde un potencial de reposo de -50 mV se aplicaron pulsos despolarizantes desde -40 mV a +60 mV con incrementos de 10 mV durante 300 ms a una frecuencia de 0.2 Hz. La amplitud de I_{CaL} se midió como la diferencia entre la corriente medida al pico máximo y la corriente al final del pulso. Para comparar diferentes células, las corrientes de cada célula se expresaron como densidad de corriente, calculada como la amplitud de corriente normalizada por la capacitancia de membrana.

SOLUCIÓN REGISTRO I_{CaL}	
Compuesto	Concentración mM
NaCl	140
CsCl	5,4
CaCl ₂	1,8
MgCl ₂	1,1
Glucosa	10
Hepes	5
pH=7,4 con NaOH	

Tabla 14. Composición de la solución de registro de I_{CaL} para los estudios *in vivo*

SOLUCIÓN INTERNA I _{CaL}	
Compuesto	Concentración mM
EGTA	5
CsCl	100
TEA	20
Hepes	10
GTPNa ₂	0,4
ATPNa ₂	5
Fosfocreatina	5
CaCl ₂	0,06
pH=7,2 con CsOH	

Tabla 15. Composición de la solución interna de I_{CaL} para los estudios *in vivo*

4. DETERMINACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

Para analizar la homeostasis del calcio intracelular en cardiomiocitos aislados de ratón adulto se utilizó un microscopio confocal Leica SP5. Para la visualización y medición del calcio intracelular se cargaron los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo de cada animal con un indicador fluorescente, 0,66 μ M de Fluo-3 AM (acetometilester) (Molecular Probes) disuelto en ácido plurónico al 20% en DMSO durante 30 minutos a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. El indicador puede entrar en el cardiomiocito en forma de éster y disuelto en ácido plurónico y una vez en el interior las fosfodiesterasas citosólicas liberan el Fluo-3 del residuo AM. Este Fluo-3 libre emite fluorescencia al unirse a iones calcio libres. De esta forma se puede analizar la cantidad de calcio citosólico presente en la célula en respuesta a un estímulo o en células quiescentes. Tras los 30 minutos de incubación con el fluoróforo, se decantaron las células durante 5 minutos y cuando se formó el pellet se retiró el sobrenadante. A continuación las células se reconstituyeron en 500 μ l de solución estándar filtrada (Ver tabla 16). Las imágenes se captaron a una velocidad de escaneo de 700 Hz. El fluoróforo se excitó a 490 nm y la emisión de fluorescencia fue captada entre 500 y 700 nm.

Para los experimentos en los que se analizaron los transitorios de calcio se utilizó la técnica de estimulación de campo o field stimulation. Las células se estimularon a 2 Hz y se registraron imágenes a una velocidad de escaneo de 700 Hz. Los transitorios se analizaron de la siguiente forma:

Se obtuvieron imágenes como las que se muestran a continuación. La flecha negra indica el punto en el que se inicia la contracción celular. Desde ese punto se midió el pico de la fluorescencia. La amplitud del transitorio se obtuvo de la relación entre el pico de fluorescencia y la fluorescencia basal (F/F_0). Asimismo, se analizó la constante de caída de la fluorescencia (τ) y el tiempo de salida del calcio desde el retículo al citosol, esto es el tiempo al pico de fluorescencia.

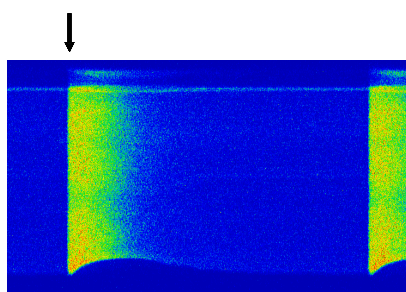


Figura 35. Imagen de un transitorio de calcio obtenida mediante microscopía confocal

Además, del análisis de estas imágenes se obtuvo el acortamiento celular, resultado de la diferencia de longitud celular al inicio del transitorio y en el punto en el que se observa un acortamiento máximo de la misma.

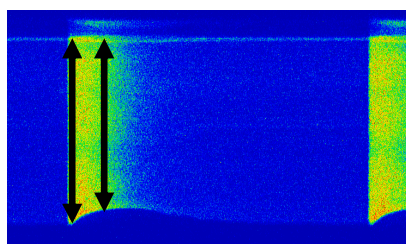


Figura 36. Imagen de la medición del acortamiento celular obtenida mediante microscopía confocal

A continuación, se dejaron de estimular las células y tras unos 30 segundos se registraron los eventos espontáneos de liberación de calcio (sparks) en células en reposo, para de esta forma poder analizar la cantidad de calcio liberada por el retículo en células quiescentes.

De las imágenes así obtenidas se analizaron la frecuencia de aparición de sparks, marcados con una flecha negra, así como su duración, anchura y la amplitud entendiéndose esta como la relación entre la fluorescencia máxima y la fluorescencia basal (F/F_0)

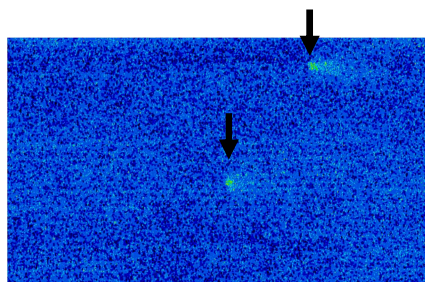


Figura 37. Imagen de los sparks de calcio obtenida mediante microscopía confocal

Finalmente, para analizar la carga del retículo, se registró la salida de calcio al citosol tras perfundir la célula con una solución de cafeína a una concentración de 10 mM. La velocidad de escaneo en este caso fue de 400 Hz. Para llevar a cabo este protocolo, las células se estimularon a 2 Hz y tras 10 estímulos se abrió la perfusión de cafeína. Una vez la cafeína alcanzó la célula, se paró el estímulo de campo y se continuó registrando hasta que el calcio liberado desapareció del citoplasma celular. Nuevamente se analizó la amplitud de la fluorescencia (F/F_0) así como la constante de caída de la misma (τ)

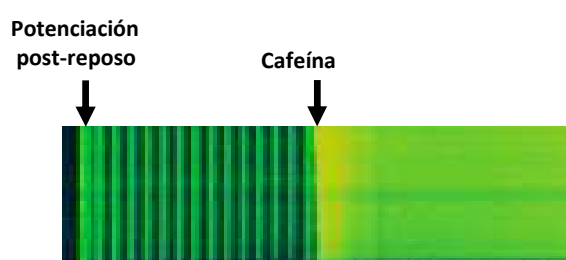


Figura 38. Imagen de los registros obtenidos mediante microscopía confocal tras la infusión de cafeína 10 mM

En estas imágenes obtenidas en células que habían permanecido sin estimular durante al menos 1 minuto, también se midió la fluorescencia obtenida en el primer transitorio evocado mediante la estimulación de campo.

Para analizar los transitorios, los eventos espontáneos de liberación de calcio y la liberación de calcio al retículo tras la perfusión con cafeína, se utilizó el software IDL 8.2.

SOLUCIÓN ESTÁNDAR CONFOCAL	
Compuesto	Concentración mM
NaCl	140
MgCl ₂	1,1
CaCl ₂	1,8
KCl	4
Glucosa	10
Hepes	10
pH=7,4 con LiOH	
SOLUCIÓN DE CAFEÍNA	
Cafeína	10

Tabla 16. Composición de la solución estándar para los experimentos con microscopía confocal

5. RT-PCR CUANTITATIVA

La PCR o Reacción en cadena de la Polimerasa, desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80 [484] utiliza la replicación del ADN a partir de una secuencia, de manera que es capaz de amplificar hasta un millón de veces cantidades muy pequeñas de material genético, obteniéndose de esta reacción una cantidad suficiente para ser analizado.

La polimerasa usa ADN de cadena simple como molde o “templado” para la síntesis de su cadena complementaria. Para que esta reacción de síntesis tenga lugar, se necesita además una pequeña secuencia o sección de ADN de cadena doble. Los cebadores o “primers” son secuencias cortas de oligonucleótidos (aproximadamente 20 nucleótidos) de cadena simple, complementarios a los extremos de una secuencia molde. Junto con el ADN de cadena simple, se encargan de formar esta sección de cadena doble.

El diseño de los cebadores (marcados con sonda) los realizó TIB MOLBIOL teniendo en cuenta la estabilidad y complementariedad de estos cebadores con la secuencia a analizar y su especificidad o bien se compraron como kit previamente puesto a punto a Applied Biosystems.

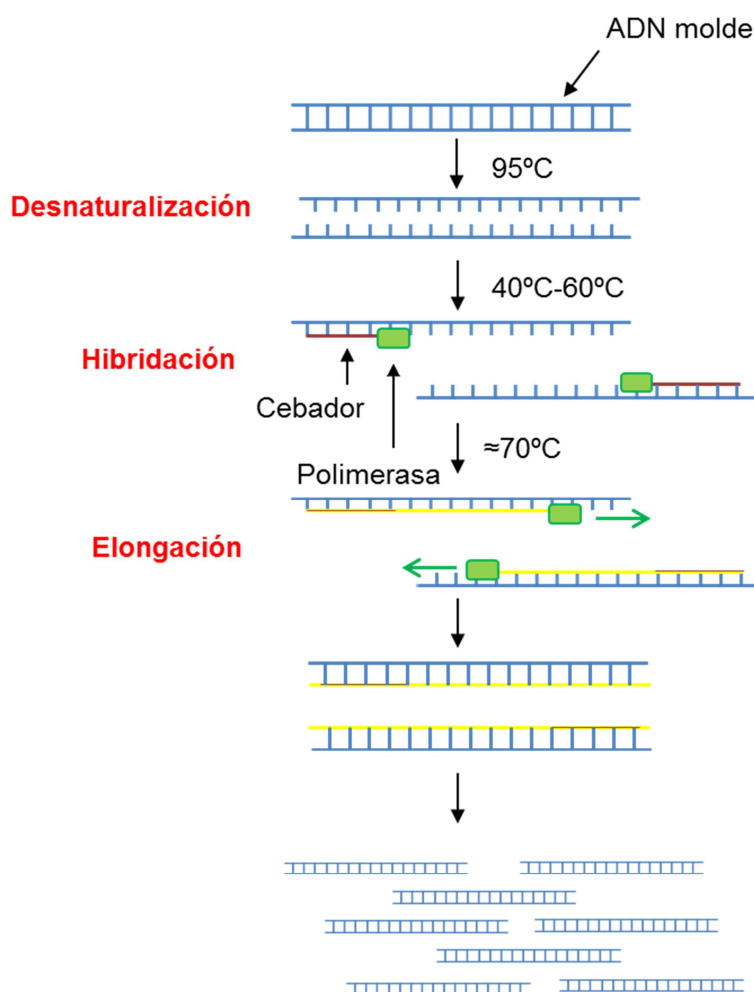


Figura 39. Descripción de las fases de desnaturalización, hibridación y elongación de la PCR

5.1 CONTROL INTERNO

En el desarrollo de la PCR cuantitativa es de suma importancia la utilización de un control normalizador que evite los pequeños errores de manipulación del ADN copia (ADNc) generado en la retro-transcripción. Puesto que la PCR cuantitativa es muy sensible, cualquier error de pipeteo puede interferir con los resultados. Para evitar ese problema, se utilizan controles internos positivos y cada muestra se normaliza por su control.

Para elegir el control interno, se tuvo en cuenta que su expresión no se modificara en los distintos grupos experimentales estudiados. Para la realización de los siguientes experimentos se utilizó como control interno positivo (housekeeping gene) el 18S rRNA.

Para nuestros experimentos se utilizaron sondas Taqman tanto para los cebadores del gen problema como para los cebadores del control interno positivo, marcados con distintos fluoróforos. De esta forma, en cada pocillo de la placa se pudieron estudiar el gen diana y su correspondiente control positivo.

5.2 DESARROLLO DE LA TÉCNICA

Las etapas para el desarrollo de la PCR cuantitativa se detallan a continuación:

- **OBTENCIÓN DE LA MUESTRA**

Las muestras que se utilizaron para la realización de la PCR cuantitativa fueron los miocitos procedentes de corazones de rata, tratados con vehículo o con leptina (Ver figura 32). Las células tratadas, se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos y el precipitado se congeló a -80°C.

Las muestras así obtenidas se trataron con TRIzol (Invitrogen) para extraer el ARN total (1 ml por cada 5-10 millones de células). Se agitaron en un vortex durante 20 minutos a 4°C y a continuación se dejaron reposar 10 minutos a 4°C. Seguidamente, se añadió cloroformo para separar el ADN y las proteínas del ARN. Las muestras se agitaron y se mantuvieron en reposo 10 minutos. A continuación, las muestras con el TRIzol y el cloroformo se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 rpm a 4°C. Tras este período, se observan dos fases claras, una fase orgánica en el fondo del eppendorf, donde se encuentran el ADN y las proteínas y otra fase acuosa por encima de la fase orgánica que contiene el ARN.

A continuación, ayudados de una pipeta, se recogió la fase acuosa con cuidado de no arrastrar la fase orgánica. Una vez obtenida la fase acuosa, se le añadió isopropanol puro en volumen igual al de la fase acuosa recogida. El isopropanol facilita la precipitación del ARN. Las muestras con el isopropanol se mantuvieron a -20°C durante 12 horas.

Tras estas 12 horas, se centrifugaron las muestras a 4°C durante 15 minutos a 13000 rpm para conseguir precipitar el ARN. Una vez precipitado el ARN retiramos el isopropanol y dejamos secar

el ARN para evitar que queden restos de alcohol. Una vez seco, el ARN se lavó con etanol al 75% y tras eliminarlo y dejarlo secar bien se añadió un volumen de entre 10 y 30 μ l de agua DEPC (0,1%)

Posteriormente se valoró la cantidad de ARN total con la ayuda de un espectrofotómetro Nanodrop (Bio-Rad). El ratio de absorbancia a 260/280 nm que mostraron las muestras estuvo comprendido entre 1.8 y 2, lo cual indicaba que la pureza de las muestras era adecuada para continuar con la PCR cuantitativa.

• TRANSCRIPCIÓN INVERSA

Para la obtención de ADNc se utilizó un kit de retrotranscripción (Qiagen).

El protocolo utilizado fue el siguiente.

Se añadieron 2 μ l de gDNA Wipeout Buffer (7X) a 1 μ g de ARN y agua libre de RNAasa hasta completar 14 μ l de reacción. Esta mezcla se incubó durante 2 minutos a 42°C en un termociclador (Bio-Rad). Tras los dos minutos de incubación, los eppendorf que contenían la mezcla se llevaron a 4°C y se añadió 1 μ l de transcriptasa inversa y 5 μ l de una mezcla del tampón de RT y de los cebadores suministrados por el kit en una proporción de (4:1). El volumen final de la reacción fue de 20 μ l. Esta mezcla se incubó en el termociclador a 42°C durante 15 minutos y posteriormente a 95°C durante 3 minutos para inactivar la transcriptasa inversa.

El ADNc obtenido se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

• REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

DESNATURALIZACIÓN DEL ADN

La doble cadena del ADNc se desnaturaliza y se obtienen cadenas simples que después serán el molde para los cebadores

HIBRIDACIÓN

Mediante la hibridación conseguimos la unión de los cebadores a las regiones complementarias de la cadena simple de ADNc, generando “templados” adecuados para la ADN polimerasa

Los cebadores utilizados se muestran en las tablas 17 y 18.

Tabla de cebadores		
ANP	Forward 5'to 3'	ATCACCAAGGGCTTCTCCTCT
	Reverse 5'to 3'	CTAGCAGGTTCTTGAAATCCATCAGA
	Probe 5'to 3'	FAM-CCGCACTGTATACGGGATTGCTCCAAT-BBQ
β -MHC	Forward 5'to 3'	GAGCCTCCAGAGTTTGCTGAAGGA
	Reverse 5'to 3'	TTGGCACGGACTGCGTCATC
	Probe 5'to 3'	FAM-TTTCCTTTGCCCTTGCTA-BBQ
SKA	Forward 5'to 3'	CAGGCGGTGCTGTCTCTAT
	Reverse 5'to 3'	GGCAGGGCATAACCCCTATA
	Probe 5'to 3'	FAM-AACCACGGCATCGTGTGGATTC-BBQ
Cav 1.2	Forward 5'to 3'	AGCAACTCCCTCAGACGTTTG
	Reverse 5'to 3'	GCTTCTCATGGGACGGTGAT
	Probe 5'to 3'	FAM-CAACAAGACAGGGAACAACCAAGCGG-BBQ
Cav 3.2	Forward 5'to 3'	CTACGTCGATTGTAGACAGCAAG
	Reverse 5'to 3'	TGGTGAACACGATGTTGCTTATCTC
	Probe 5'to 3'	6FAM-CATGGCAGCCATCCTCGTCAATACTC-BBQ
18S rRNA	Forward 5'to 3'	GGCTACCACATCCAAGGAAG
	Reverse 5'to 3'	CAATTACAGGGCCTCGAAAGA
	Probe 5'to 3'	Tex-CGCAAATTACCCACXTCCTGACCC-BBQ

Tabla 17. Cebadores utilizados para la PCR suministrados por TIB MOLBIOL

Gen	Referencia Applied Biosys.
Kir 2.1	#Rn00568808
Kv 4.2	#Rn00581941
Kv4.3	#Rn00709608
KChIP2	#Rn04224181
18S rRNA	#4310893E

Tabla 18. Cebadores utilizados para la PCR suministrados por Applied Biosystems

EXTENSIÓN O ELONGACIÓN

En esta fase la ADN polimerasa se activa y comienza la amplificación del ADNc. La ADN polimerasa va disponiendo los nucleótidos complementarios a los de las cadenas que actúan como moldes y extendiendo los cebadores en dirección 5' a 3', produciéndose la elongación de la cadena. En el siguiente ciclo, la temperatura se lleva a 95°C para separar la nueva cadena sintetizada y el molde original. Estas hebras de cadena sencilla constituyen los templados para un nuevo ciclo de síntesis de ADNc. Estos tres pasos se suceden hasta alcanzar un número determinado de ciclos, obteniéndose ADNc amplificado.

En nuestro estudio, para los cebadores suministrados por Applied Biosystems no se programó fase de elongación puesto que el tiempo de paso de temperatura de hibridación a temperatura de desnaturalización fue suficiente para que se produjese la elongación. Esto es posible por el pequeño tamaño de las fracciones de ADN amplificadas (amplicones)

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, en un volumen final de 25 µl. Las reacciones contenían 2 µl de ADNc, 12.5 µl de Premix Ex Taq (TAKARA) y 1 µl de la mezcla de cebadores de cada gen y 1 µl de la mezcla de cebadores del control interno (Ver tabla 17 y 18). El volumen se completó hasta 25 µl con agua ultrapura.

Cada ADNc se amplificó por triplicado y se añadió un control negativo que no contenía ADNc, pero sí la mezcla de cebadores y el Premix de la reacción.

El programa de amplificación fue el siguiente:

Para los cebadores diseñados por TIB Molbiol

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Proceso
1	95	30	Desnaturalización
40	95	5	
	56	20	Hibridación
	72	15	Elongación

Tabla 19. Protocolo utilizado para los cebadores suministrados por TIB MOLBIOL

Para los cebadores suministrados por Applied biosystems

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Proceso
1	50	2	Desnaturalización
	95	10	
40	95	0,25	
	60	1	Hibridación/ Elongación

Tabla 20. Protocolo utilizado para los cebadores suministrados por Applied Biosystems

DETECCIÓN Y ANÁLISIS

La expresión de cada gen se normalizó por su control interno (18S rRNA). Las cantidades relativas de cada gen se determinaron en 8 experimentos diferentes utilizando un sistema de detección IQ5 de Bio-Rad y mediante el método comparativo de Ct mediante la fórmula $2^{-(\Delta Ct)}$ donde Ct significa (threshold cycle). El ΔCt es el Ct del ARNm diana menos el Ct del control interno. Los resultados se expresaron como el porcentaje respecto a los valores del grupo control.

6. WESTERN BLOT

El Western blot es una técnica utilizada para la detección de proteínas, presenta la ventaja de permitir la identificación de forma exacta y diferencial de una proteína determinada. Esta técnica utiliza la separación electroforética de proteínas acoplada a la detección inmunoquímica mediante el uso de un anticuerpo que se va a unir específicamente a la proteína de estudio.

Esta técnica fue utilizada para determinar el nivel de expresión o de fosforilación de diversas proteínas. (Ver tabla 25)

De forma general, podemos decir que la técnica de Western Blot puede dividirse en las siguientes etapas: Extracción de la fracción proteica de las muestras, determinación de la concentración de proteínas y preparación de la muestra; electroforesis en geles de poliacrilamida, electrotransferencia e inmunodetección.

6.1 EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA Y MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Para el análisis de proteínas, las muestras utilizadas en la presente tesis doctoral fueron cardiomiocitos ventriculares de rata o ratón adultos. Tras el aislamiento de los miocitos, las células se ultracongelaron a -80°C para mantener la integridad de las proteínas. La homogenización de las muestras se llevó a cabo de forma manual en un homogeneizador teflón-vidrio, que se mantuvo en hielo durante todo el proceso de homogenización y en el que se añadieron 500 μl del cóctel de homogenización (Ver composición en tabla 21)

Composición cóctel homogenización	
COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
Tris	50 mM
Sacarosa	320 mM
DTT	1 mM
Inhibidores de fosfatasas	1%
Inhibidores de proteasas	1%
Inhibidor de tripsina	1%
pH=7	

Tabla 21. Composición del cóctel de homogenización de muestras para obtener el extracto proteico total

A este cóctel se le añadió IGEPAL CA-630 a una concentración del 2% para facilitar la extracción de las proteínas unidas a membrana.

La muestra homogeneizada se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos, para así separar las proteínas citoplasmáticas y de membrana solubilizadas (en el sobrenadante) del resto de orgánulos intracelulares (en el precipitado). La fracción soluble fue recogida y congelada a -80°C hasta su posterior utilización. Antes de la inmunodetección de proteínas, la concentración proteica se determinó mediante el método de Bradford [485]. El fundamento de la técnica se basa en la medición de la extinción provocada por el cambio en el espectro visible de un colorante (Coomasie Blue G-250) cuando éste se une a las proteínas (absorbiendo así a 595 nm). Esta unión se realiza a través de grupos ionizados y se comprueba proporcionalidad con la concentración de proteínas

contenidas en la muestra. La determinación del contenido proteico de una muestra requiere la comparación del valor de absorbancia de la muestra con los obtenidos a partir de cantidades conocidas de proteínas (generalmente albúmina sérica bovina), con los que se construye una curva de calibración: a mayor cantidad de proteínas, mayor color desarrollado y por lo tanto, mayor absorbancia.

6.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La técnica SDS-PAGE (del inglés sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) se ha utilizado como método de separación de las diferentes proteínas en función de la masa molecular específica de cada una de ellas. El detergente aniónico SDS además de desnaturalizar las proteínas forma complejos con dichas proteínas que tienen una carga negativa constante. Estos complejos son capaces de migrar hacia un polo positivo (ánodo) en un campo eléctrico. Por tanto, la migración de cada proteína dependerá de la masa molecular de la misma.

- Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon normalizando la cantidad de proteína a cantidades de entre 20 µg y 80 µg en función de la proteína a analizar. A continuación, se desnaturalizaron mediante la adición de la solución Laemli (4X) (Ver composición tabla 22) y además, se calentaron a 95°C durante 5 minutos.

Composición de la solución de Laemli 4X	
Compuesto	Cantidad
β-mercaptoetanol	8%
Tris	312,5 mM
SDS	10%
Glicerol	4%
Azul de bromofenol	Punta de espátula

Tabla 22. Composición del tampón de carga Laemli 4X

- Preparación de los geles de poliacrilamida para la electroforesis

Las muestras se separaron en geles de poliacrilamida. Estos geles estaban formados por un gel concentrador en la parte superior o stacking gel con una concentración de acrilamida del 4% y un gel separador o running gel con una concentración de acrilamida de entre el 7% y el 12% en función del peso molecular de la proteína a analizar. La polimerización de los geles se inició por la adición de persulfato de amonio (APS) y se aceleró mediante la adición de N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED).

En primer lugar se preparó el gel separador (Acrilamida 7-12%, Tris 1.5M a pH=8.8, SDS al 10%, APS al 10% y TEMED) que fue vertido en el interior de los cristales de polimerización. Tras la gelificación del gel separador se preparó el gel concentrador (Acrilamida 4%, Tris 0.5M a pH=6.8, SDS al 10%, APS al 10% y TEMED). Esta solución se vertió encima del gel separador y en la parte superior se ajustaron los peines que forman los pocillos del gel. Una vez polimerizó el gel, se colocaron en la cubeta de electroforesis Mini –protean (Bio-Rad), que se rellenó con la solución tampón para la electroforesis elaborado a partir de una solución madre 10 veces concentrada (ver composición en tabla 23)

Composición del tampón de electroforesis 10X	
Compuesto	Concentración
Tris	1 M
Glicina	1.9 M
SDS	10%
pH= 8.3	

Tabla 23. Composición del tampón de electroforesis 10 veces concentrado

- Electroforesis

En los pocillos del gel se cargaron las muestras a analizar además de un marcador de peso molecular. A continuación se fijó un voltaje constante de 120 voltios y se corrió la electroforesis hasta que el frente de proteínas salió por la parte inferior del gel.

6.3 ELECTROTRANSFERENCIA

Se realizó una transferencia húmeda en un equipo Mini Trans-Blot (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a una membrana de poliviniliden difluoruro (PVDF) de 0.45 μm de diámetro de poro (Amersham Biosciences).

Para rellenar la cubeta de transferencia se utilizó un tampón de Tris-Glicina (Tris 125 mM; Glicina 0.96 M) a partir del cual se preparó el tampón de transferencia (Ver composición en tabla 24)

Composición del tampón de transferencia	
Compuesto	Cantidad
Tampón Tris-Glicina	20%
Metanol	20%
Agua	60%

Tabla 24. Composición del tampón de transferencia

La transferencia se realizó a 4°C fijando un valor de amperaje constante de 200 mA durante 2 horas y en el caso de los receptores de rianodina se fijó un voltaje constante de 100 voltios durante 2 horas.

6.4 INMUNODETECCIÓN

Una vez realizada la transferencia, la membrana se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de leche en polvo libre de grasa al 5% en TBS (Tris 1M y NaCl 3M a pH=7.4).

Una vez bloqueada la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Ver tabla 25) en TBS-tween (al 0.1%). El anticuerpo primario se incubó a 4°C, en agitación suave durante toda la noche. Tras la incubación, la membrana se lavó con TBS-tween durante 1 hora en 4 lavados sucesivos de 15 minutos, con agitación fuerte y a temperatura ambiente.

Tras el lavado para retirar el exceso de anticuerpo primario, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase o HRP) o bien con un fluoróforo para su detección en un equipo de detección de inmunofluorescencia. El tiempo de incubación con el anticuerpo secundario fue de 1 hora, en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, la membrana se lavó durante 1 hora, en 4 lavados sucesivos de 15 minutos, con agitación fuerte y a temperatura ambiente.

Para los anticuerpos secundarios marcados con HRP, la detección se realizó mediante la utilización del sustrato ECL Prime (Amersham Biosciences). La enzima HRP cataliza la oxidación del sustrato, produciendo una reacción luminiscente capaz de impresionar una película de auto-radiografía o de ser detectada por un equipo dotado con una cámara CCD (Chemi-doc Bio-Rad) para la detección de quimioluminiscencia. En el caso de la fluorescencia, los fluoróforos que marcan los anticuerpos secundarios son excitados con un láser y posteriormente, la señal que emiten es recogida por un equipo de detección (Odyssey Fc). Las bandas así obtenidas se cuantificaron mediante análisis densitométrico utilizando el programa informático ImageJ. El nivel expresión de las proteínas se normalizó por la expresión de la proteína GAPDH como control de carga o por la expresión de la proteína total en el caso de las fosforilaciones.

Tabla de anticuerpos utilizados				
Anticuerpo anti-	Referencia	Huésped	Dilución	Casa comercial
Akt	4685	Conejo	1/5000	Cell signaling
p-Akt (Thr308)	9275	Conejo	1/2000	Cell signaling
eNOS/NOS3	610297	Ratón	1/1000	BD Transduction Laboratories
p-eNOS (Ser1177)	9570	Conejo	1/1000	Cell signaling
ERK 1/2	9102	Conejo	1/5000	Cell signaling
p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	9101	Conejo	1/2000	Cell signaling
GADPH	AM4300	Ratón	1/5000	Ambion
JNK 1/2	9252	Conejo	1/1000	Cell signaling
p-JNK 1/2 (Thr183/Tyr185)	9255	Conejo	1/1000	Cell signaling
KChIP2	PA1-927	Conejo	1/1000	Thermo Scientific. Pierce
Kv4.2	AB5360	Conejo	1/200	Millipore
Kv4.3	APC-017	Conejo	1/200	Allomone labs
Lisinas-acetiladas	9814	Conejo	1/1000	Cell signaling
NCX	R3F1	Ratón	1/1000	Swant
p38	9212	Conejo	1/1000	Cell signaling
p-p38 (Thr180/Tyr182)	4511	Conejo	1/1000	Cell signaling
P70S6K	9202	Conejo	1/1000	Cell signaling
p-P70S6K (Thr389)	9206	Ratón	1/500	Cell signaling
PLB	A010-14	Ratón	1/5000	Badrilla Ltd.
p-PLB (Ser16)	A010-12	Conejo	1/5000	Badrilla Ltd.
p-PLB (Thr17)	A010-13	Conejo	1/5000	Badrilla Ltd.
RyR2	MA3-925	Ratón	1/5000	Affinity Bioreagents
p-RyR2 (Ser2808)	A010-30	Conejo	1/1000	Badrilla Ltd.
p-RyR2 (Ser2814)	A010-31	Conejo	1/2000	Badrilla Ltd.
SIRT-1	2028	Conejo	1/500	Cell signaling
STAT-3	4904	Conejo	1/1000	Cell signaling
p-STAT-3 (Tyr705)	9131	Conejo	1/1000	Cell signaling

Tabla 25. Anticuerpos utilizados

7. INMUNOPRECIPITACIÓN DE eNOS

La técnica de inmunoprecipitación se basa en la separación de las proteínas de estudio presentes en los lisados celulares u homogenados tisulares del resto de proteínas, a través de su interacción con anticuerpos específicos. Los complejos que se forman entre la proteína y el anticuerpo se precipitan a través de la adición de una fase sólida, en este caso formada por la proteína A (proteína procedente del *Staphylococcus aureus* con gran afinidad por el fragmento Fc del anticuerpo) y la proteína G (procedente de diversos *Streptococcus* de los grupos C y G con gran afinidad por el fragmento Fc del anticuerpo) unidos a la resina particulada Sepharosa. Como la Sepharosa es inerte e insoluble, por centrifugación se puede separar el inmunocomplejo de interés, que se deposita en el precipitado, del resto de proteínas, que permanecerán en el sobrenadante.

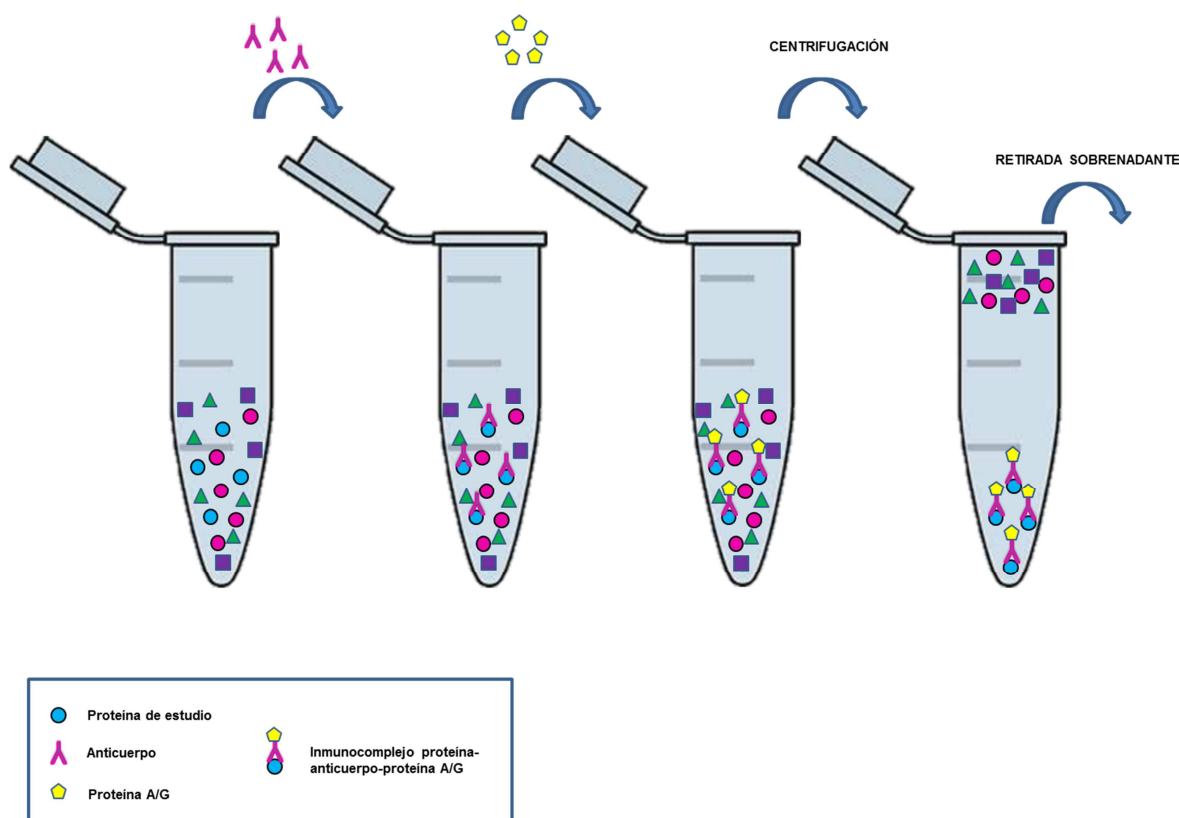


Figura 40. Descripción del protocolo de inmunoprecipitación. Al extracto proteico total se añadió el anticuerpo. Tras la incubación con el mismo se añadió la proteína A/G y se mantuvieron los eppendorf en agitación constante 24h. Tras la retirada del sobrenadante el pellet se usó para la técnica de Western blot.

En la presente tesis doctoral, la técnica de inmunoprecipitación. Se utilizó para precipitar la enzima eNOS presente en los cardiomiocitos ventriculares de ratones tratados con leptina durante tres

semanas a una concentración de 0.36 mg/kg/día. Mediante la técnica de Western blot, utilizando el precipitado, se determinó la cantidad de proteína acetilada para de esta forma determinar la cantidad relativa de enzima activa.

Para ello, se utilizó la fracción soluble del homogenado de los cardiomiocitos ventriculares y se midió la proteína utilizando el método de Bradford [485]. Para la inmunoprecipitación se usó 1 mg de proteína de cada muestra. El anticuerpo usado fue anti-eNOS monoclonal (BD Transduction Laboratories) y el sistema de precipitación fue proteína A/G unida a Sepharosa. A cada muestra se añadió 1 µg del anticuerpo. Para facilitar la unión entre el anticuerpo y la proteína, la muestra se mantuvo en ligera rotación durante 3 horas a 4°C. A continuación se añadieron 10 µl del complejo proteína A-Sepharosa y otros 10 µl del complejo proteína G-Sepharosa y esta mezcla se mantuvo en rotación moderada a 4°C durante toda la noche. Tras la incubación se centrifugó cada muestra a una velocidad de 10000 rpm durante 30 segundos para sedimentar los inmunocomplejos formados y separarlos del resto de proteínas. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó 4 veces con el cóctel de homogenización (Ver tabla 21). Tras el último lavado, el precipitado fue reconstituido en solución de Laemli 1X (Bio-Rad). Para romper la unión entre el anticuerpo y la proteína A/G-Sepharosa, se calentó la muestra a 65°C durante 10 minutos.

Para el análisis de las acetilaciones, se realizó una separación electroforética de cada muestra mediante electroforesis en gel de acrilamida y a continuación las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF. Tras el bloqueo durante una hora con leche descremada en polvo en TBS a una concentración del 5%, se incubó la membrana durante toda la noche con el anticuerpo anti acetil-lisinas (1/1000) y a continuación con el anticuerpo secundario frente a conejo (1/5000). Se analizó la densidad óptica de la banda obtenida en el peso de la eNOS (en torno a los 140 KDa). Los valores obtenidos se normalizaron por la cantidad de eNOS inmunoprecipitada en cada muestra.

8. DETERMINACIÓN DE LEPTINA MEDIANTE ELISA

Para analizar la concentración de leptina en los cardiomiocitos de los ratones C57BL6J, se utilizó el siguiente Kit de ELISA: LEPTIN MOUSE ELISA KIT KMC2281 Novex® (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante.

Para las muestras de cardiomiocitos se usó el extracto proteico total. A continuación se determinó la cantidad de proteína óptima a cargar para obtener unos niveles de detección dentro del rango de linealidad del kit.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se muestran como media \pm SEM. Las poblaciones de datos recogidas en la presente tesis doctoral se ajustan a una distribución normal, por lo tanto, se ha utilizado una *t* de student para comparar dos grupos independientes. Cuando se compararon 3 o más grupos se utilizó la ANOVA de una vía seguida del post-test Bonferroni. Se definieron como estadísticamente significativos valores de $P < 0.05$.

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad-Prism 5.0 (GraphPad-Software, San Diego)

10. COMPUESTOS UTILIZADOS

Leptina: Sigma Aldrich

Triciribina: Sigma Aldrich

PD98059: Sigma Aldrich

Rapamicina: Sigma Aldrich

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL EFECTO PRO-HIPERTRÓFICO DE LEPTINA EN CARDIOMIOCITOS VENTRICULARES ADULTOS

1.1 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LEPTINA SOBRE EL TAMAÑO DE LOS CARDIOMIOCITOS

Para analizar si leptina induce hipertrofia, los miocitos aislados del corazón de ratas Wistar adultas se trataron con leptina a una concentración de 100 ng/ml o con el vehículo (agua) durante 48 horas. La concentración de leptina se eligió en base a los valores plasmáticos encontrados en pacientes obesos [486, 487] y en estudios in vitro previos [96].

La figura 41 muestra el resultado de 19 experimentos. En cada experimento, se obtuvo el tamaño celular midiendo la superficie celular de 20 células control y 20 tratadas con leptina, elegidas al azar. En total se obtuvieron los valores de superficie celular de 380 cardiomiocitos controles y 380 tratados con leptina. Tras las 48 horas de tratamiento con leptina a una concentración de 100 ng/mL se observó un aumento significativo en la superficie celular de los cardiomiocitos.

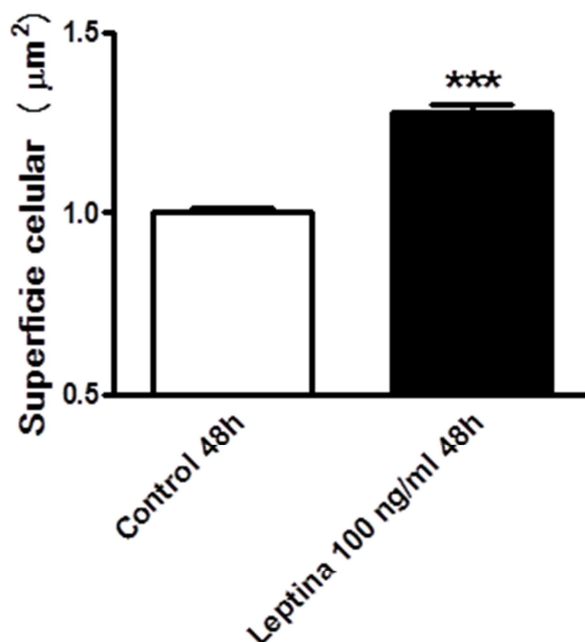


Figura 41. El tratamiento con leptina a una concentración de 100 ng/ml durante 48 horas induce un incremento significativo de la superficie celular. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=380). *** P<0.001

Con la finalidad de conocer si el efecto de leptina sobre la superficie celular era dependiente de la concentración, se incubaron las células con distintas concentraciones de leptina. Como se observa en la figura 42 el efecto de leptina sobre la superficie celular fue dependiente de la concentración.

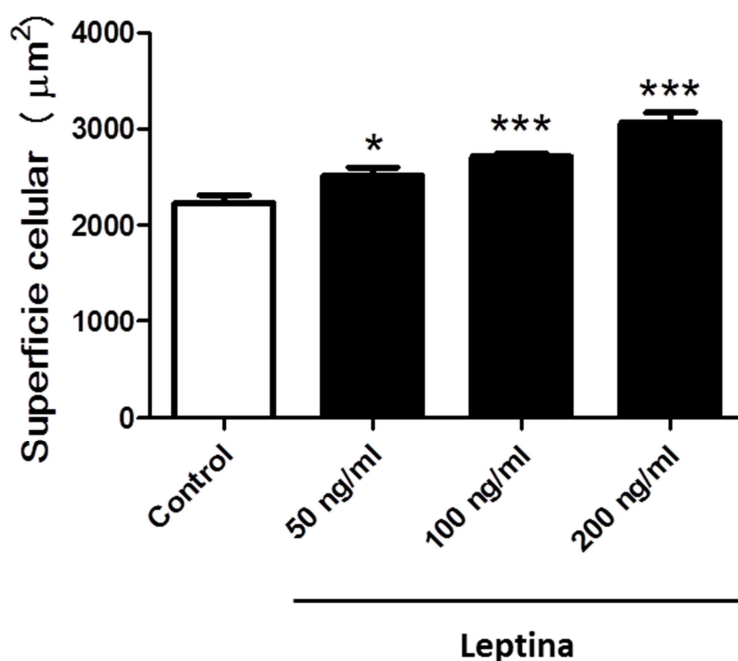


Figura 42. Dependencia de la concentración del incremento de la superficie celular inducido por la leptina. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. (Control n=380; 50ng/ml n=80; 100 ng/ml n=380; 200ng/ml n=80). *P<0.05; ***p<0.001

Para corroborar el efecto de leptina en el tamaño de los cardiomiocitos, se determinó la capacitancia de la membrana, que es una medida indirecta de la superficie celular [488], en 17 cardiomiocitos controles y en 24 cardiomiocitos tratados con leptina. La capacitancia de membrana se determinó utilizando la técnica de patch clamp (ver apartado de Metodología). En la figura 43 se puede observar que el tratamiento con leptina a una concentración de 100 ng/ml durante 48 horas indujo un incremento significativo en la capacitancia de membrana.

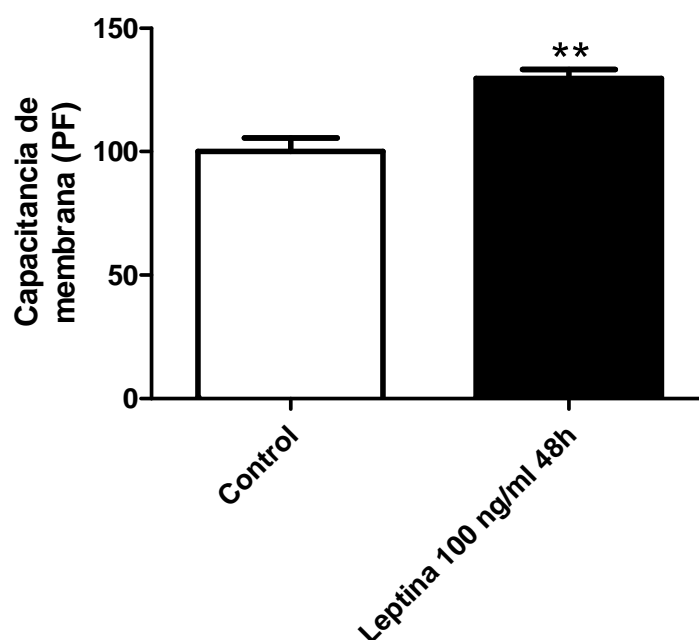


Figura 43. El tratamiento con 100 ng/ml de leptina durante 48 horas indujo un incremento significativo en la capacitancia de membrana celular. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. (Control n=17; Leptina n=24). **P<0.01

1.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm DE VARIOS GENES FETALES COMO MARCADORES DE LA HIPERTROFIA EN CARDIOMIOCITOS CONTROLES Y TRATADOS CON LEPTINA

En el siguiente grupo de experimentos, se analizaron los niveles de ARNm del péptido natriurético atrial (ANP), la cadena pesada de la β -miosina (β -HMC) y la α -actina esquelética (SKA), genes fetales que se regulan al alza en los corazones adultos hipertróficos en respuesta a un estímulo patológico [365, 367, 370]. La figura 44 muestra que solo la cadena pesada de la β -MHC y la SKA se regularon al alza en los cardiomiocitos tratados con leptina, mientras que la expresión de ANP no se vio alterada por el tratamiento.

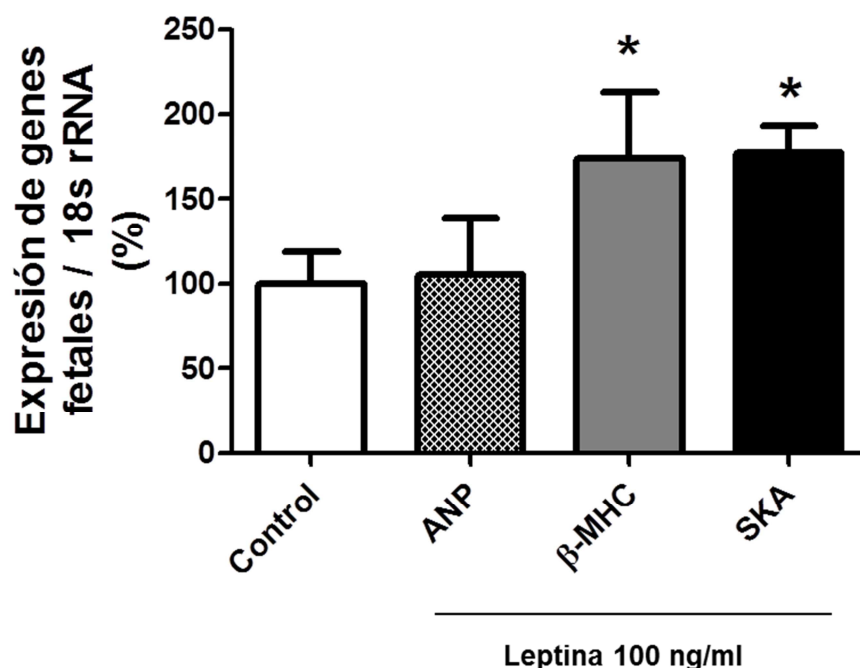


Figura 44. El tratamiento con 100 ng/ml de leptina durante 48 horas indujo un incremento significativo en los niveles de ARNm de β -MHC y SKA pero no de ANP. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. (n=6). *P<0.05

1.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR LEPTINA EN CARDIOMIOCITOS ADULTOS

Tradicionalmente, la activación del receptor cardiaco de leptina OB-Rb se ha asociado con la activación de la vía de Janus quinasa (JAK)/ STAT (de sus siglas en inglés Signal Transducer Activator of Transcription), pero también con la activación de las vías de PI3K-Akt y las MAPK que se han relacionado con cardioprotección e hipertrofia de los cardiomiocitos [82, 489].

Por lo tanto, se trataron los cardiomiocitos ventriculares adultos con una concentración de leptina de 100 ng/ml a distintos tiempos de entre 15 y 60 minutos y tras el tratamiento se analizaron mediante Western blot de sus formas fosforiladas, las activaciones de las MAPK: p38, JNK 1/2 y ERK 1/2, así como de STAT-3 y Akt en respuesta a leptina.

En la figura 45 se muestran la proporción de la forma fosforilada en relación a la proteína total de las MAPK analizadas. En presencia de leptina, se observó un incremento significativo de la

fosforilación de ERK 1/2 así como de p38 a los 30 minutos del inicio del tratamiento. Sin embargo, JNK 1/2 no se vio afectada por el tratamiento con la leptina.

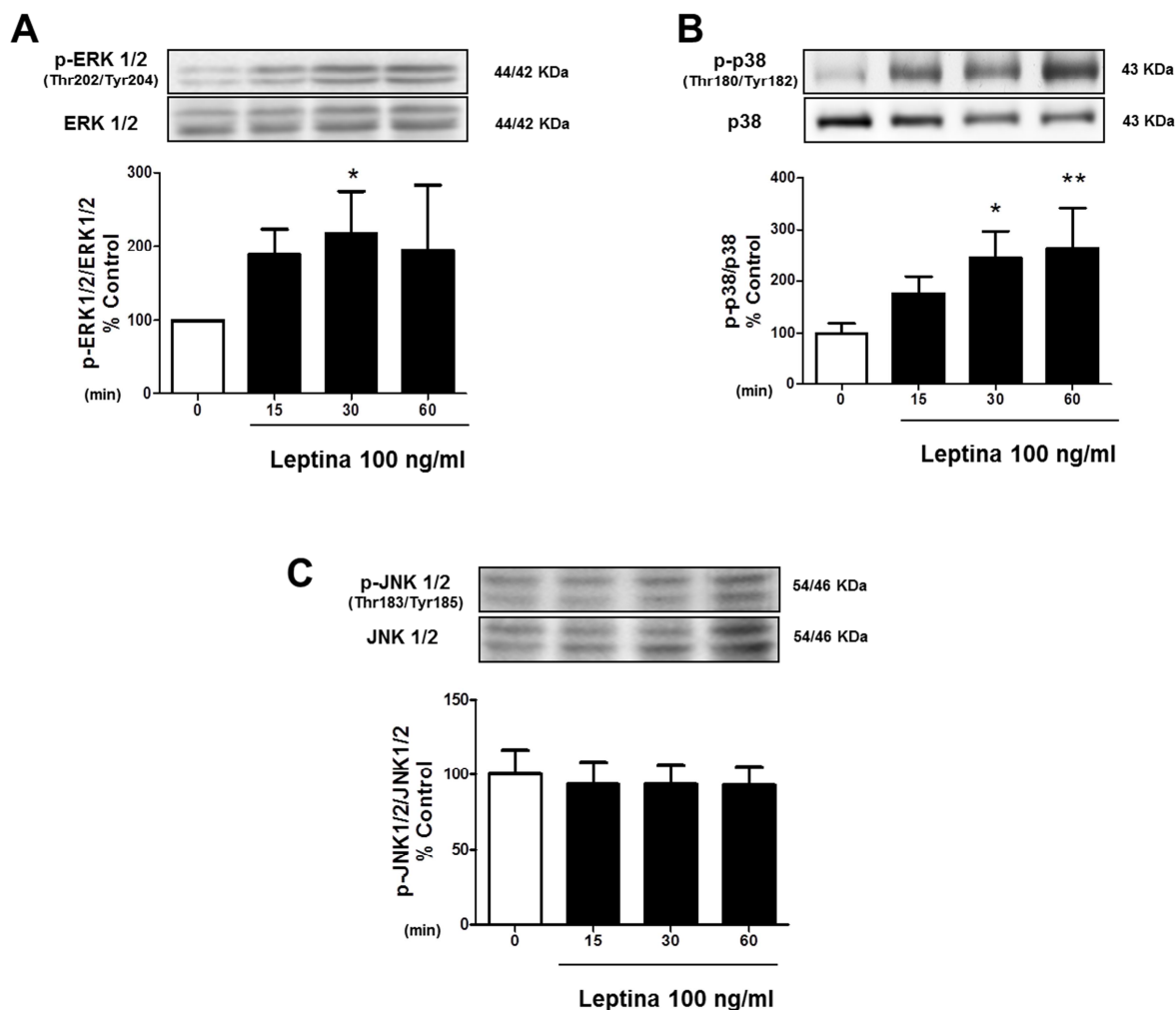


Figura 45. El tratamiento con 100 ng/ml de leptina durante 48 horas indujo un incremento significativo en la fosforilación de ERK1/2 (A) y p38 (B) pero no en JNK1/2 (C). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. (n=5). *P<0.05; **P<0.01

La figura 46 muestra la activación significativa de la fosforilación de las vías de Akt y de STAT-3. Las células se trataron con una concentración de leptina de 100 ng/ml. 15 minutos después del inicio del tratamiento se observó un incremento significativo de la activación de Akt. La activación de STAT-3 se observó a los 30 minutos del inicio del tratamiento.

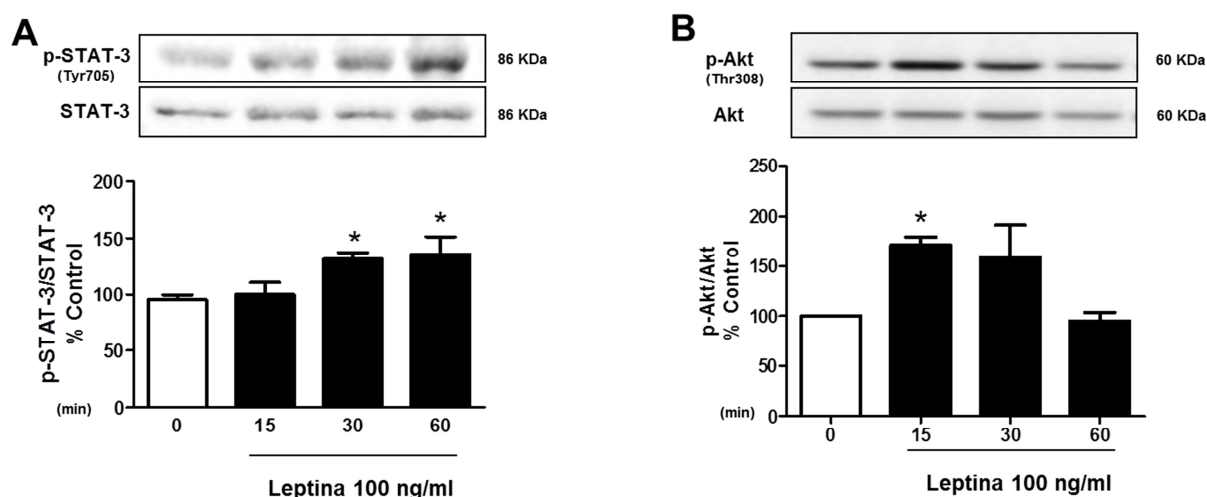


Figura 46. El tratamiento con 100 ng/ml de leptina durante 48 horas indujo un incremento significativo en la fosforilación de STAT-3 (A) y Akt (B). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. (n=5). *P<0.05

1.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR LEPTINA E IMPLICADAS EN SU EFECTO PRO-HIPERTRÓFICO

1.4.1 IMPLICACIÓN DE LA VIA DE Akt EN EL EFECTO PRO-HIPERTRÓFICO DE LEPTINA

Puesto que la activación de Akt y ERK1/2 se ha relacionado con la hipertrofia de los cardiomiocitos, para analizar la posible implicación de la vía se pre-trataron las células con un inhibidor de la activación de Akt, triciribina, a una concentración de 1 μ M durante 1 hora a 37°C. A continuación, se trataron las células con leptina a una concentración de 100 ng/ml.

En la figura 47A se puede observar que en presencia de triciribina, leptina no indujo un aumento en la activación de la Akt a los 15 minutos del tratamiento. A continuación, analizamos el efecto del pre-tratamiento con triciribina sobre el incremento de superficie celular inducido por leptina a las 48 horas. El pre-tratamiento con triciribina previno completamente el incremento de la superficie celular inducido por leptina en cardiomiocitos ventriculares de rata adulta.

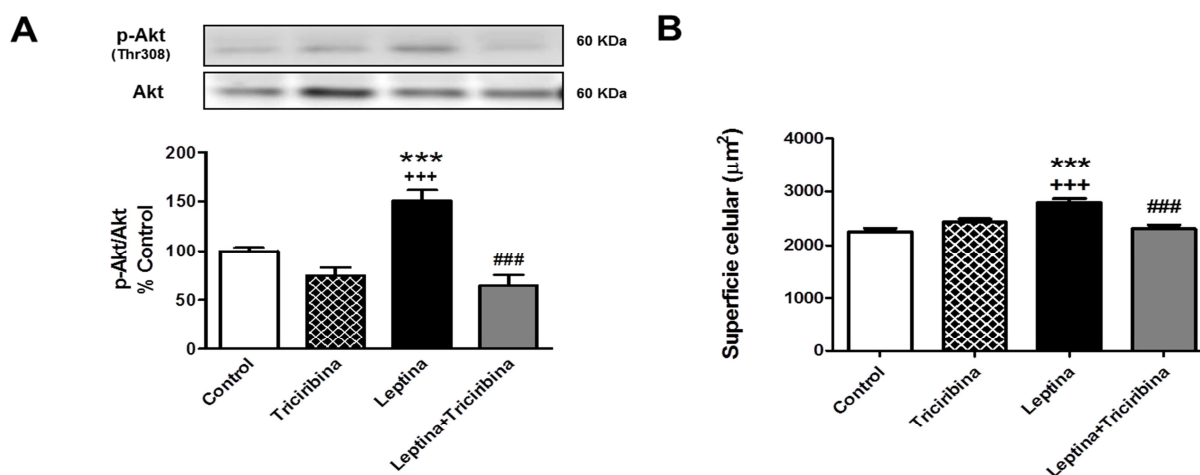


Figura 47. (A) El pre-tratamiento de los cardiomiocitos con triciribina $1\mu\text{M}$ previno totalmente el incremento de la fosforilación de Akt ($n=5$) y (B) el incremento de superficie celular inducidos por leptina ($n=100$). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. *** $P<0.001$ vs. Control +++ $P<0.001$ vs. Triciribina y ### $P<0.001$ vs Leptina

Se sabe la que Akt activada puede fosforilar otras dianas como mTOR, que se ha relacionado con hipertrofia cardiaca. [490-492]. Para determinar la implicación de la vía de Akt/mTOR, se analizó el efecto de leptina en p70S6K, el principal efector de la vía de mTOR. En la figura 48A se puede observar que tras 30 minutos de tratamiento con leptina se produjo una activación significativa de la quinasa de la vía de mTOR p70S6K. Tanto el pre-tratamiento de las células con el inhibidor de Akt, triciribina a una concentración de $1\mu\text{M}$, como el pre-tratamiento durante 1 hora con el inhibidor de mTOR, rapamicina a una concentración de $10\mu\text{M}$, previnieron por completo la activación de p70S6K inducida por leptina como se observa en la Figura 48B. A continuación, se analizó el efecto del pre-tratamiento con rapamicina en el incremento de la superficie celular inducida por leptina. El incremento del tamaño de los cardiomiocitos inducido por leptina se previno con triciribina y con el inhibidor de mTOR rapamicina (Figura 48C). Estos datos sugieren, que la activación de la vía de Akt/mTOR/p70S6K es crucial para la hipertrofia de los cardiomiocitos inducida por leptina.

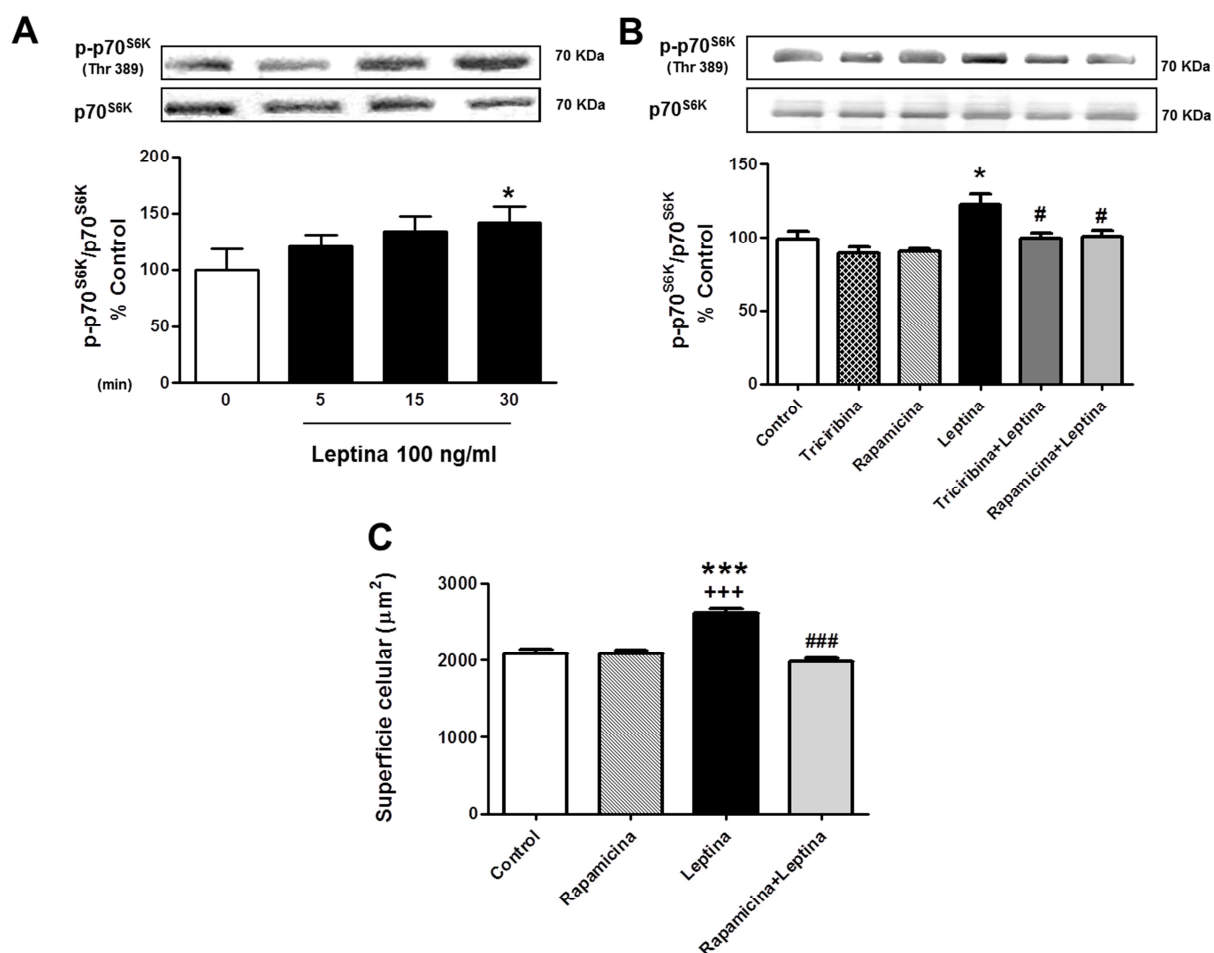


Figura 48. (A) El tratamiento con 100 ng/ml de leptina durante 48 horas indujo un incremento significativo en la fosforilación de P70S6K. (B) El pre-tratamiento de los cardiomiocitos con triciribina $1\mu\text{M}$ y Rapamicina $10\mu\text{M}$ previno totalmente el incremento de la fosforilación de P70S6K ($n=5$) y (C) el incremento de superficie celular inducidos por leptina ($n=100$). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. * $P<0.05$ y *** $P<0.001$ vs. Control; +++ $P<0.001$ vs. Rapamicina; # $P<0.05$ y ### $P<0.001$ vs Leptina

1.4.2 IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE ERK1/2 EN EL EFECTO PRO-HIPERTRÓFICO DE LEPTINA

Para analizar la posible implicación de la vía de ERK 1/2 en la hipertrofia de los cardiomiocitos, las células se pre-trataron con el inhibidor de la vía de ERK 1/2 PD98059 a una concentración de $20\mu\text{M}$ durante 1 hora a 37°C .

Como se puede observar en la figura 49A el pre-tratamiento de las células con PD98059, previno la activación de ERK 1/2 a los 30 minutos. A continuación, se analizó el efecto del pre-tratamiento con PD98059 sobre el incremento de superficie celular. Como se puede ver en la figura 49B, el pre-

tratamiento con PD98059 previno el incremento de la superficie celular inducido por leptina en cardiomiocitos ventriculares de rata adulta.

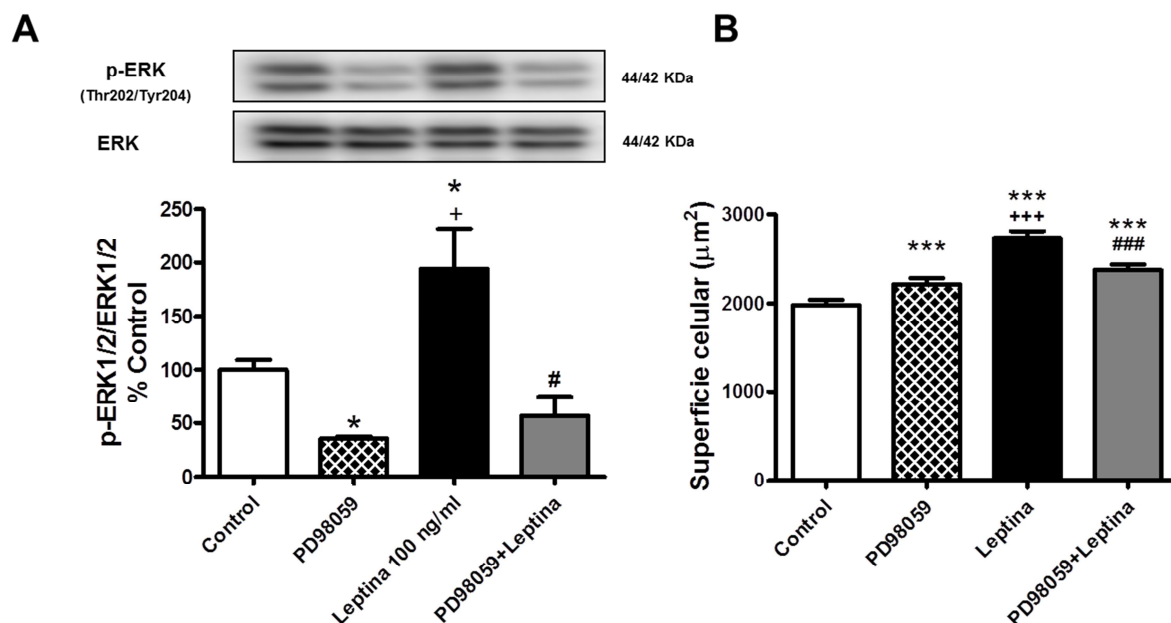


Figura 49. (A) El pre-tratamiento de los cardiomiocitos con PD98059 20 μM previno el incremento de la fosforilación de ERK (n=5) y (B) el incremento de superficie celular inducidos por leptina (n=100). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. *P<0.05 y ***P<0.001 vs. Control; +P<0.05 y +++P<0.001 vs. PD98059 y #P<0.05 y ###P<0.001 vs Leptina

1.4.2.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PD98059 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE Akt

La figura 49A muestra que el tratamiento de las células solo con el inhibidor de ERK 1/2 produjo una disminución significativa de la fosforilación de ERK1/2 respecto a las células control. Esta inhibición de ERK1/2 con PD98059 indujo un incremento significativo de la superficie celular (Figura 49B). Recientemente, se ha puesto de manifiesto que existe una relación directa entre las vías de Akt y ERK 1/2 y se han establecido diferentes circuitos de retroalimentación positiva y negativa entre las dos vías [493]. De esta forma, una inhibición de ERK1/2 podría tener como consecuencia una activación de la vía de Akt.

Puesto que la incubación de los cardiomiocitos adultos con el inhibidor de ERK1/2 produjo una disminución significativa de la fosforilación de ERK 1/2 respecto al control, quisimos analizar el efecto de la inhibición de ERK1/2 en la activación de la vía de Akt. Para ello, se trataron las células con el PD98059 durante 15, 30 ó 60 minutos y tras ese tiempo se realizaron mediciones de la fosforilación de Akt en esas muestras mediante la técnica de Western blot.

En la figura 50A se puede observar que la incubación de los cardiomiocitos adultos con el inhibidor de ERK1/2 PD98059 a una concentración de 20 μ M indujo una activación significativa de la vía de Akt.

La regulación al alza de la actividad de la vía de Akt puede inducir, asimismo, una activación de la vía de ERK1/2, por lo tanto, en el siguiente grupo de experimentos se analizó en los miocitos tratados triciribina a una concentración de 1 μ M, el efecto de este inhibidor de Akt sobre la actividad de ERK1/2.

El tratamiento de los cardiomiocitos ventriculares adultos con el inhibidor de Akt durante 1 hora no modificó la fosforilación de la vía de ERK1/2 (figura 50B). Sin embargo, en células tratadas con leptina 100 ng/ml, en las que leptina indujo un incremento significativo de la actividad de ERK1/2 tras 30 minutos de incubación, el pre-tratamiento de las células durante 1 hora con triciribina 1 μ M, previno ese incremento en la fosforilación de ERK1/2 inducido por leptina. Estos datos sugieren que para que leptina active ERK1/2 es necesaria una activación previa de la vía de Akt.

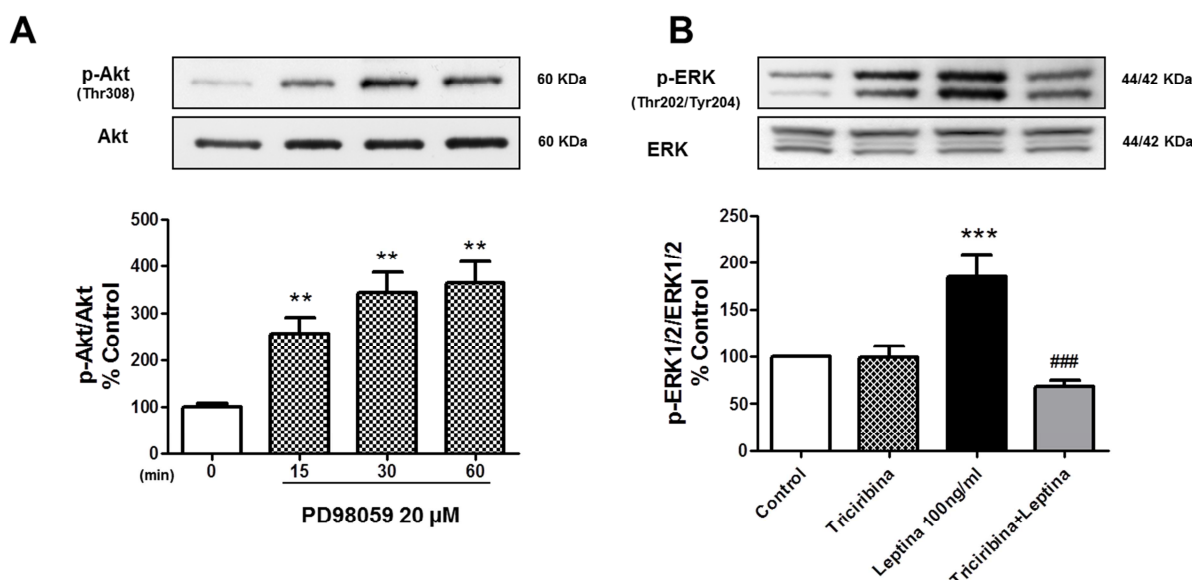


Figura 50. (A) El tratamiento de los cardiomiocitos con PD98059 20 μ M indujo un incremento significativo de la fosforilación de Akt (n=5) y (B) el pre-tratamiento con triciribina previno el incremento de la fosforilación de ERK inducido por leptina (n=5). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. **P<0.01 y ***P<0.001 vs. Control; ###P<0.001 vs Leptina

Para confirmar que el efecto pro-hipertrofico del inhibidor de la vía de ERK1/2 PD98059 podría estar mediado por una activación de Akt como consecuencia de la inhibición de ERK1/2, las células se pre-trataron durante 1 hora con triciribina a una concentración de 1 μ M y a continuación se trataron con PD98059 durante 30 minutos. En las células pre-tratadas con triciribina, el PD98059 no indujo una activación de Akt, sino que se observa una inhibición significativa de la fosforilación de esta vía respecto a las células incubadas con el vehículo (figura 51A). En el caso de la ERK1/2, como se ilustra en la figura 51B, en presencia de los dos inhibidores también se observa una disminución significativa de la activación de esta vía.

A continuación, se pre-incubaron las células durante 1 hora con triciribina y posteriormente se trataron durante 48 horas con el inhibidor de ERK1/2 PD98059. En estas condiciones, PD98059 no indujo un incremento significativo de la superficie celular (Figura 51C). Estos datos sugieren, que el efecto pro-hipertrofico que presenta el PD98059 está mediado por la activación de Akt y que esta activación se induce como consecuencia de la inhibición de ERK1/2. Sin embargo, en presencia de leptina se produce un incremento de la fosforilación de Akt y de ERK1/2, y en estas condiciones la inhibición de ERK1/2 a niveles controles previene el incremento de superficie celular inducido por

leptina. Este dato sugiere que la activación de ERK1/2 como consecuencia de la activación de Akt en las células tratadas con leptina contribuye al efecto pro-hipertrófico de la misma. Sin embargo, cuando la vía de ERK1/2 se inhibe por debajo de los valores basales, se produce una activación de la vía de Akt que asimismo es capaz de inducir un incremento de la superficie celular en los cardiomiocitos ventriculares adultos.

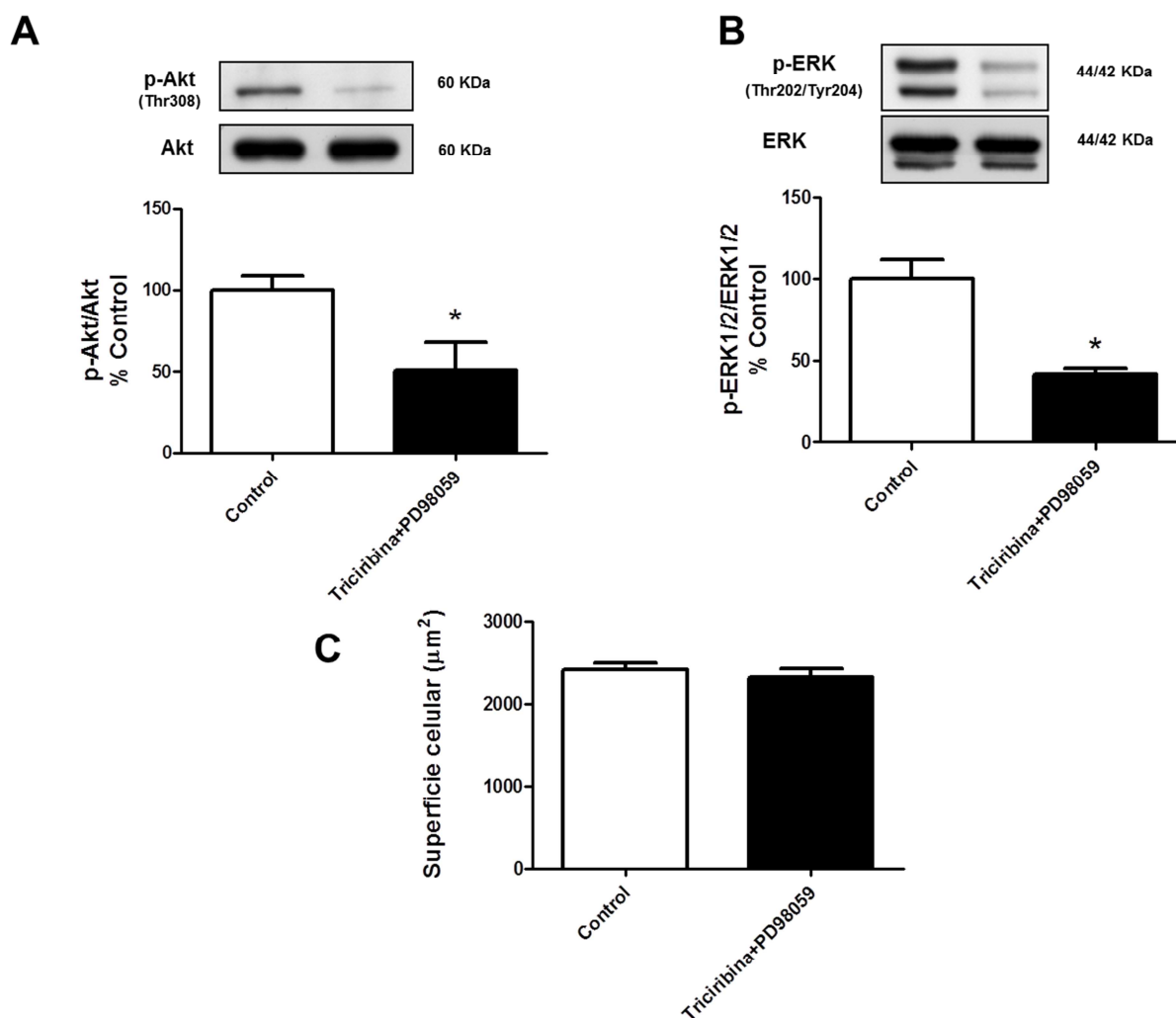


Figura 51. (A) El tratamiento de los cardiomiocitos con triciribina 1 μM y PD98059 20 μM indujo una disminución de los niveles de fosforilación de Akt y (B) ERK1/2 (n=5) (C) El pre-tratamiento con triciribina previno el incremento de la superficie celular inducido por PD98059 (n=100). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. *P<0.05 vs. Control

RESUMEN: Leptina induce un efecto pro-hipertrófico en los cardiomiocitos ventriculares adultos de la rata que es dependiente de la concentración y que se acompaña de una activación del programa de genes fetales. Este efecto pro-hipertrófico está mediado por la activación de la vía de Akt/mTOR/P70S6K y de ERK1/2, que en los miocitos ventriculares adultos parece requerir de una activación previa de Akt. Además, una inhibición de ERK1/2 por debajo de los niveles basales induce hipertrofia en los cardiomiocitos por un mecanismo que implica una activación de la vía de Akt.

2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LEPTINA SOBRE EL REMODELADO ELÉCTRICO EN CARDIOMIOCITOS ADULTOS

El remodelado iónico es un fenómeno que puede contribuir a las alteraciones en el ritmo cardiaco que ocurren en un corazón patológico [482, 483, 494]. Una prolongación en el potencial de acción ventricular, que con frecuencia ocurre en el corazón insuficiente, y que aumenta el riesgo de arritmias, se asocia con regulaciones a la baja de las corrientes repolarizantes de potasio [482, 495, 496]. Además, las alteraciones en los canales de potasio son una de las principales causas del remodelado electrofisiológico en la patología cardiaca. De hecho, la corriente de potasio I_{tof} , que juega un papel importante en la determinación de la heterogeneidad regional de la repolarización de los cardiomiocitos y en la contractilidad cardiaca [497], se regula a la baja en un gran número de modelos de hipertrofia ventricular izquierda e insuficiencia cardiaca [391, 392, 498]. Además, en la hipertrofia ventricular izquierda y en la insuficiencia cardiaca se ha observado una regulación a la baja de la corriente rectificadora de potasio I_{K1} , que juega un papel importante en la fase final de la repolarización y en el mantenimiento de la estabilidad del potencial de reposo ventricular [495, 498].

Por otro lado, en la hipertrofia cardiaca y la insuficiencia se han observado modificaciones en las corrientes de calcio tipo L y tipo T [393, 499]. La corriente de calcio tipo L constituye la entrada principal de calcio a los miocitos, contribuye a la fase de meseta del potencial de acción y es fundamental para el proceso de excitación-contracción cardiaco. Estudios de esta corriente en modelos de hipertrofia e insuficiencia cardiaca han arrojado resultados dispares. En algunos de

estos estudios se ha observado una disminución de la corriente [500, 501] pero otros no mostraron cambios [502, 503]. Además, el canal de calcio tipo T, presente en los cardiomiocitos ventriculares del neonato y en las células marcapasos, que en condiciones normales no se expresa en el ventrículo adulto, puede reexpresarse en determinadas condiciones patológicas [393, 504].

En los últimos años, ha aumentando el interés por entender los mecanismos implicados en los efectos de leptina sobre la función y el remodelado cardiacos [165, 481, 505]. Sin embargo, al inicio de la presente Tesis Doctoral se desconocía si un tratamiento a largo plazo con leptina puede modular la expresión de los canales iónicos en el tejido cardiaco.

Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue analizar en cardiomiocitos ventriculares adultos el efecto a largo plazo de un tratamiento con leptina sobre la expresión y función de los principales canales que participan en la fase de repolarización del potencial de acción del ventrículo de la rata [429].

2.1 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LEPTINA SOBRE LA EXPRESIÓN GENICA DE LAS SUBUNIDADES α DE LOS PRINCIPALES CANALES IMPLICADOS EN LA FASE DE REPOLARIZACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN

En un primer grupo de experimentos, se trataron los cardiomiocitos adultos durante 48 horas con 100 ng/ml de leptina. Tras 48 horas de tratamiento se analizó mediante RT-PCR la expresión de las subunidades Kv4.2 y Kv4.3 y KChIP2 que son las responsables de la corriente transitoria de potasio I_{tof} , de la subunidad Kir2.1, responsable de la corriente rectificadora de entrada potasio (I_{K1}) y de las subunidades Cav1.2 del canal de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}) y Cav3.1 del canal de calcio tipo T (I_{CaT}). En la figura 52A se muestra que leptina indujo un aumento significativo en la expresión génica de las subunidades Kv4.2 y Kv4.3 y de la subunidad KChIP2, de sus siglas en inglés (Kv Channel-Interacting protein2), una subunidad reguladora de la expresión y propiedades la I_{tof} ventricular. Sin embargo, no produjo cambios en la expresión génica de las subunidades Kir2.1 y Cav1.2 y Cav3.1 (Figura 52B y 52C)

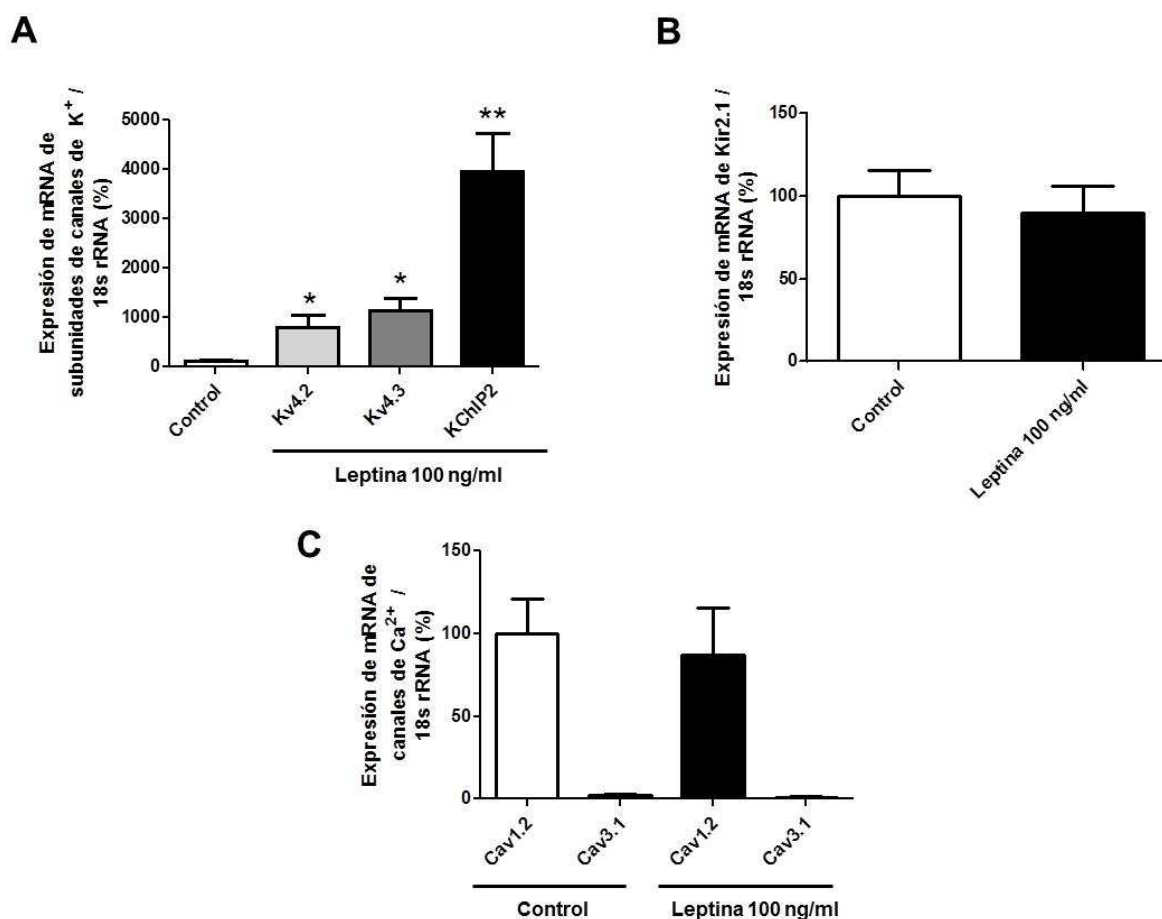


Figura 52. (A) El tratamiento de los cardiomiocitos con leptina a una concentración de 100 ng/ml indujo un incremento de los niveles de ARNm de las subunidades Kv4.2 y Kv4.3 pero no de (B) Kir2.1 ni de (C) Cav1.2 y Cav3.1. (n=6) Los resultados se expresan como la media \pm SEM. *P<0.05 vs. Control

2.2 CARACTERIZACION DEL EFECTO DE LEPTINA SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE Kv4.2, Kv4.3 y KCHIP2

El siguiente paso fue determinar si leptina puede también regular al alza la expresión proteica de estas subunidades. Para ello, tratamos los cardiomiocitos adultos con 100 ng/ml de leptina durante 48 horas y tras el tratamiento analizamos mediante Western blot los niveles de proteína de dichas subunidades.

La figura 53A y 53B muestran que leptina también es capaz de inducir un incremento significativo en la expresión proteica de las subunidades Kv4.2 y Kv4.3 en miocitos adultos. Además, en la

figura 53C se puede observar que la subunidad auxiliar del canal, KChIP2, también se regula al alza por el tratamiento con leptina.

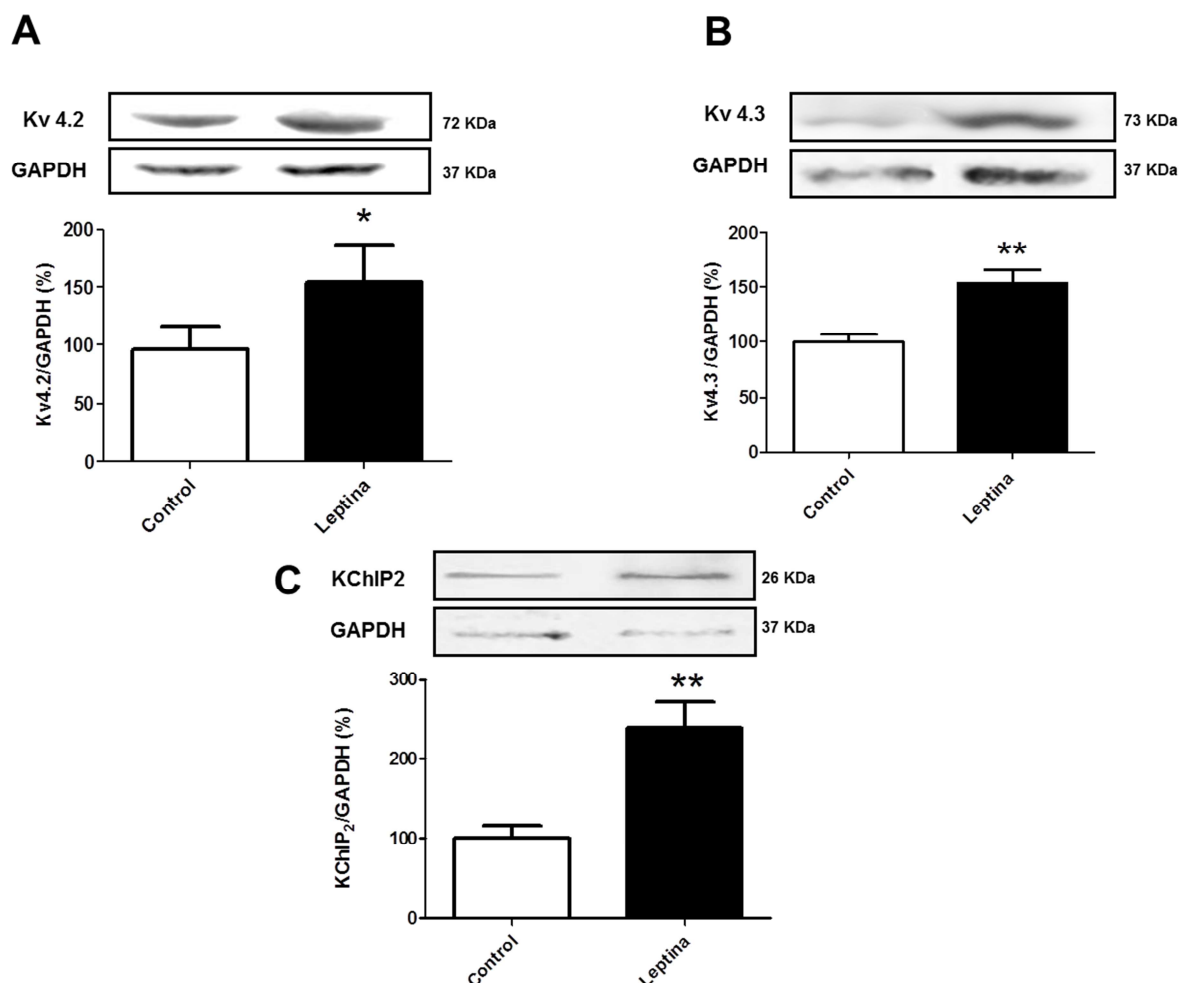


Figura 53. (A) El tratamiento de los cardiomiocitos con leptina a una concentración de 100 ng/ml indujo un incremento de la expresión proteica de Kv4.2, de (B) Kv4.3 y (C) de la subunidad reguladora KChIP2 (n=5) Los resultados se expresan como la media \pm SEM. *P<0.05 y **P<0.01 vs. Control

2.3 CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LAS PRINCIPALES CORRIENTES REPOSABLES DE LA FASE DE REPOLARIZACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN

2.3.1 ANÁLISIS DE I_{K1} E I_{CaL}

Como se ha mostrado previamente (figura 52B y C) el tratamiento con leptina 48 h no modificó la expresión génica de la subunidad Kir2.1, responsable de la corriente rectificadora de potasio (I_{K1}), ni

la expresión génica de la subunidad Cav1.2 del canal de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}). Con la finalidad de comprobar si alteraba la funcionalidad de estos canales, hemos utilizado la técnica del patch clamp en su configuración de célula entera para analizar la dependencia del voltaje de la densidad de la corriente I_{K1} y I_{CaL} en cardiomiocitos controles y tratados con leptina.

La figura 54A muestra registros representativos de las corrientes I_{K1} de dos cardiomiocitos aislados. Los registros de I_{K1} se obtuvieron al aplicar 14 pulsos de 800 ms de duración desde un potencial de fijación de -40 mV hasta potenciales comprendidos entre -120 mV y 0 mV, en incrementos de 10 mV. I_{K1} se midió como la corriente sensible a Ba^{2+} (Ver Métodos). Los pulsos aplicados evocaron corrientes similares en los cardiomiocitos control y en los tratados con leptina. La figura 54B muestra las relaciones densidad de corriente-voltaje de los cardiomiocitos control (círculos blancos) y los cardiomiocitos tratados con leptina (círculos negros). En este caso, la amplitud de la I_{K1} se normalizó por la capacitancia de membrana para obtener la densidad de corriente. El tratamiento con leptina no indujo modificaciones en la densidad de la I_{K1} .

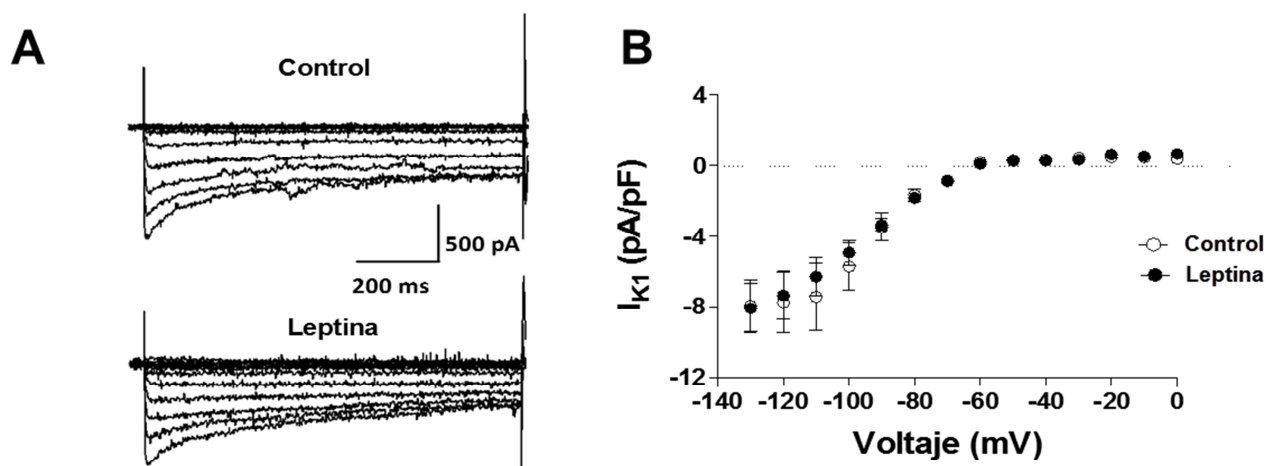


Figura 54. (A) Registro típico obtenido en un miocito control y otro tratado con leptina. (B) El tratamiento de los cardiomiocitos con leptina a una concentración de 100 ng/ml no indujo modificación en la densidad de la I_{K1} (Control n=5 y Leptina n=6) Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

En otro grupo de experimentos se registró la I_{CaL} en los miocitos tratados con leptina y en los miocitos controles. De nuevo se utilizó la técnica de patch clamp en su configuración de célula entera. Los registros de I_{CaL} se obtuvieron al aplicar desde un potencial de fijación de -50 mV, pulsos despolarizantes de 500 ms de duración, desde -40 mV hasta +60 mV en incrementos de 10 mV. La figura 55A muestra registros representativos de la I_{CaL} de dos cardiomiocitos aislados, uno control y otro tratado con leptina. Igual que en la I_{K1} , los pulsos despolarizantes aplicados evocaron corrientes de similar magnitud en los miocitos control y en los tratados con leptina. En la figura 55B se observan las relaciones densidad-voltaje de los cardiomiocitos control (círculos blancos) y los tratados con leptina (círculos negros). El tratamiento con leptina tampoco indujo modificaciones en la densidad de la I_{CaL} .

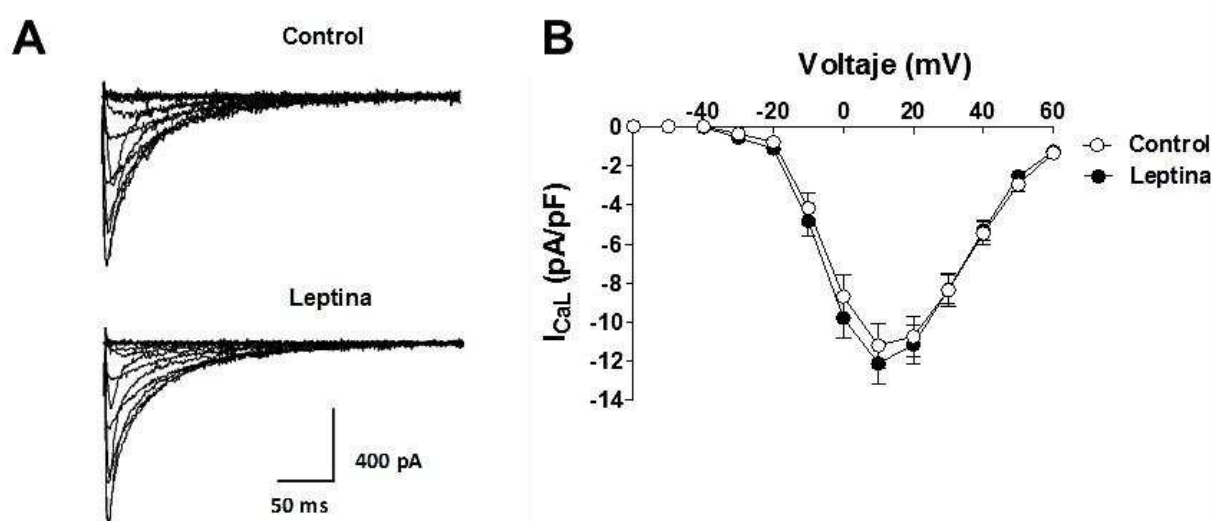


Figura 55. (A) Registro típico obtenido en un miocito control y otro tratado con leptina (B) El tratamiento de los cardiomiocitos con leptina a una concentración de 100 ng/ml no indujo modificación en la densidad de la I_{CaL} (Control $n=16$ y Leptina $n=14$). Los resultados se expresan como la media \pm SEM

2.3.2 ANÁLISIS DE LA I_{tof}

El aumento en la expresión de las subunidades Kv4.2, Kv4.3 y KChIP2 que se produce en cardiomiocitos tratados con leptina, debería ser consistente con un incremento de la amplitud y densidad de la corriente transitoria de potasio (I_{tof}). Para probar esta hipótesis, se registró la I_{tof} en respuesta a pulsos de 500 ms con potenciales de entre -70 y +60 mV en incrementos de 10 mV desde un potencial de reposo de -80 mV. Se usó un pre-pulso a -40 mV para inactivar la corriente de sodio. El intervalo entre pulsos fue de 0.1 Hz. La I_{to} sensible a 4-AP (I_{tof}) se obtuvo mediante la sustracción de las corrientes obtenidas antes y después de la aplicación de 4-AP 3mM.

La figura 56A muestra registros representativos de las I_{tof} de dos cardiomiocitos aislados. Los pulsos despolarizantes aplicados desde -10 mV a +60 mV desde un potencial de reposo de -80 mV evocaron corrientes mayores en los cardiomiocitos tratados con leptina comparados con los cardiomiocitos no tratados. La figura 56B muestra las relaciones corriente-voltaje de 22 cardiomiocitos control (círculos blancos) y 23 cardiomiocitos tratados con leptina (círculos negros). La dependencia del voltaje fue similar en los dos grupos, pero la amplitud de la I_{tof} fue significativamente mayor en las células tratadas con leptina desde 0 mV hasta 60 mV. La figura 56C muestra la relación densidad-voltaje de 22 cardiomiocitos control (círculos blancos) y 23 cardiomiocitos tratados con leptina (círculos negros). En este caso, la amplitud de la I_{tof} se normalizó por la capacitancia de membrana para obtener la densidad de corriente.

La dependencia del voltaje fue similar en los dos grupos, pero la densidad de corriente fue significativamente mayor en los cardiomiocitos tratados con leptina desde +20 mV hasta +60mV, datos que son consistentes con la mayor expresión de las subunidades Kv4.2, Kv4.3 y KChIP2 obtenidos en los miocitos tratados con leptina. La figura 56D muestra la concentración-dependencia del efecto de leptina en la densidad de I_{tof} . Los cardiomiocitos ventriculares se trataron durante 48 horas con el vehículo (Control) o con tres concentraciones diferentes de leptina: 50, 100 y 200 ng/L. El gráfico de la figura 56D muestra las medias de las densidades de la I_{tof} (a +40 mV) en células control (6.6 ± 0.7 pA/pF $n=22$) y en miocitos ventriculares tratados durante 48h con 50 ng/mL de leptina (7.0 ± 0.7 pA/pF $n=7$), 100 ng/mL de leptina (9.6 ± 1.3 pA/pF $n=23$) y 200 ng/mL de leptina (15.4 ± 3.3 pA/pF $n=6$)

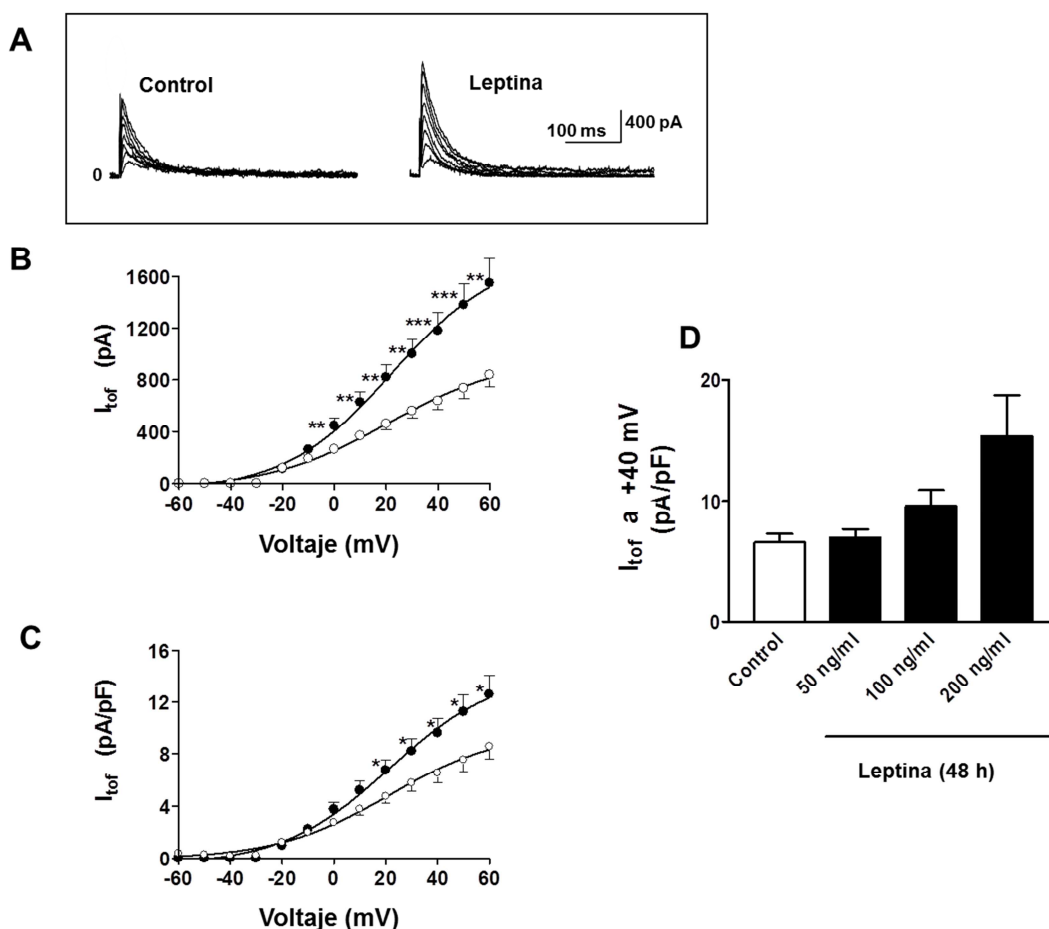


Figura 56. (A) Registro típico obtenido en un miocito control y un miocito tratado con leptina (B) El tratamiento de los cardiomiocitos con leptina a una concentración de 100 ng/ml indujo un incremento de la amplitud y (C) la densidad de I_{tof} (Control $n=22$ y Leptina $n=23$) (D) Dosis dependencia del efecto de la leptina en la I_{tof} . Los resultados se expresan como la media \pm SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ y *** $P<0.001$ vs. Control

Este aumento en la amplitud y densidad de la I_{tof} podría traducirse en un acortamiento de la duración del potencial de acción. Para analizar este posible efecto se registraron los potenciales de acción de los miocitos controles y los miocitos tratados con leptina durante 48h. La figura 57A muestra trazos representativos de registros de potenciales de acción obtenidos en un miocito control (en cuadrados blancos) y un miocito tratado con leptina (cuadrados negros). En la figura 57B se pueden observar los valores medios de la duración del potencial de acción medidos al 20, 50 y 90% de la repolarización (DPA_{20} , DPA_{50} y DPA_{90}). El tratamiento con leptina indujo una disminución significativa de la DPA_{20} (5.3 ± 0.3 ms, $n=8$ en control y 3.8 ± 0.3 ms, $n=8$ en leptina $P<0.01$)

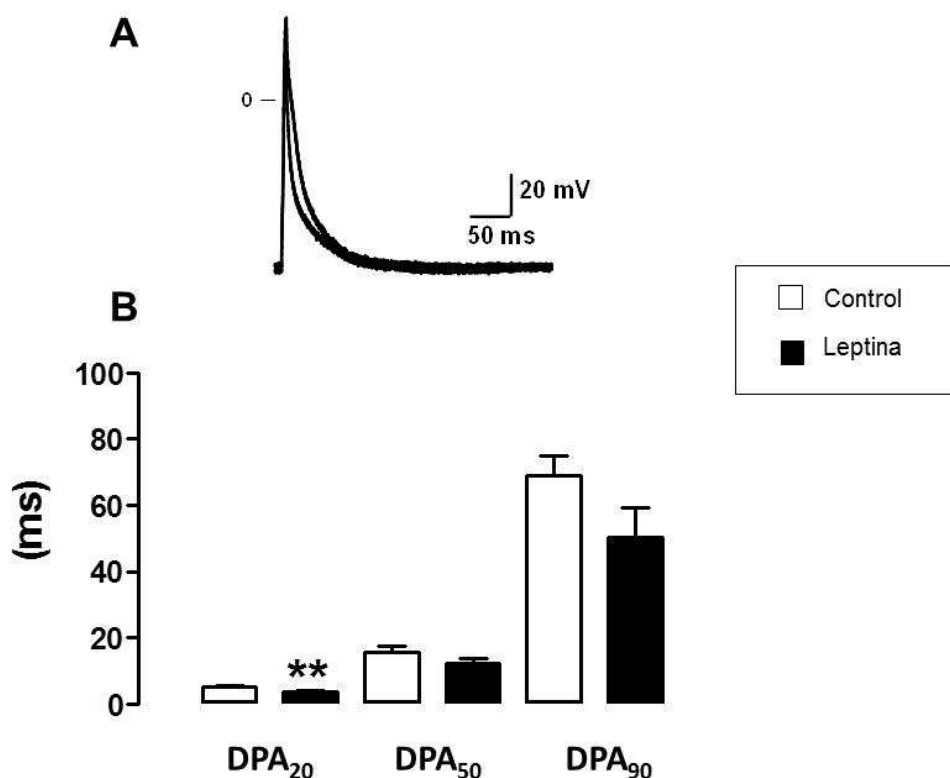


Figura 57. (A) Registro típico de los potenciales de acción obtenidos en un miocito control y un miocito tratado con leptina (B) El tratamiento de los cardiomiocitos con leptina a una concentración de 100 ng/ml indujo una disminución de la duración del potencial de acción medida al 20% de la repolarización (Control n=8 y Leptina n=8). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. **P<0.01 vs. Control

Puesto que el aumento de la I_{tof} inducido por leptina puede ser debido a modificaciones en las propiedades del canal el siguiente paso fue analizar la dependencia del voltaje de la activación e inactivación de la I_{tof} . La figura 58A muestra la conductancia normalizada (G/G_{max}) respecto al potencial de membrana en 6 cardiomiocitos control y 8 cardiomiocitos tratados con 100 ng/mL de leptina. La activación de la I_{tof} se produjo en los dos grupos a voltajes positivos de -40 mV y la activación máxima se produjo en torno a +60 mV. Las dos curvas (de los miocitos tratados y no tratados con leptina) mostraron valores similares de voltaje de semi-activación máximo (V_{50} : -35.3 \pm 1.6 mV en control frente a V_{50} : -33.4 \pm 1.7 mV en los tratados con leptina) y de pendiente (k: -5.7 \pm 0.7 mV en control a k: -5.0 \pm 0.2 mV en los miocitos tratados con leptina). La figura 58B muestra la dependencia del voltaje de la inactivación de la I_{tof} frente al potencial de membrana en 6 cardiomiocitos control y 7 miocitos tratados con 100 ng/mL de leptina. La dependencia del voltaje de la inactivación de la I_{tof} en las células tratadas con leptina durante 48 horas fue casi idéntica a la

obtenida en las células control. El voltaje de semi-activación máximo (V_{50} : -35.3 ± 1.6 mV en células control frente a V_{50} : -33.4 ± 1.4 mV en los miocitos tratados con leptina) y la pendiente (k : -5.7 ± 0.7 mV en miocitos control frente a k : -5.0 ± 0.2 mV en los miocitos tratados con leptina) fue similar en control y en el grupo tratado con leptina.

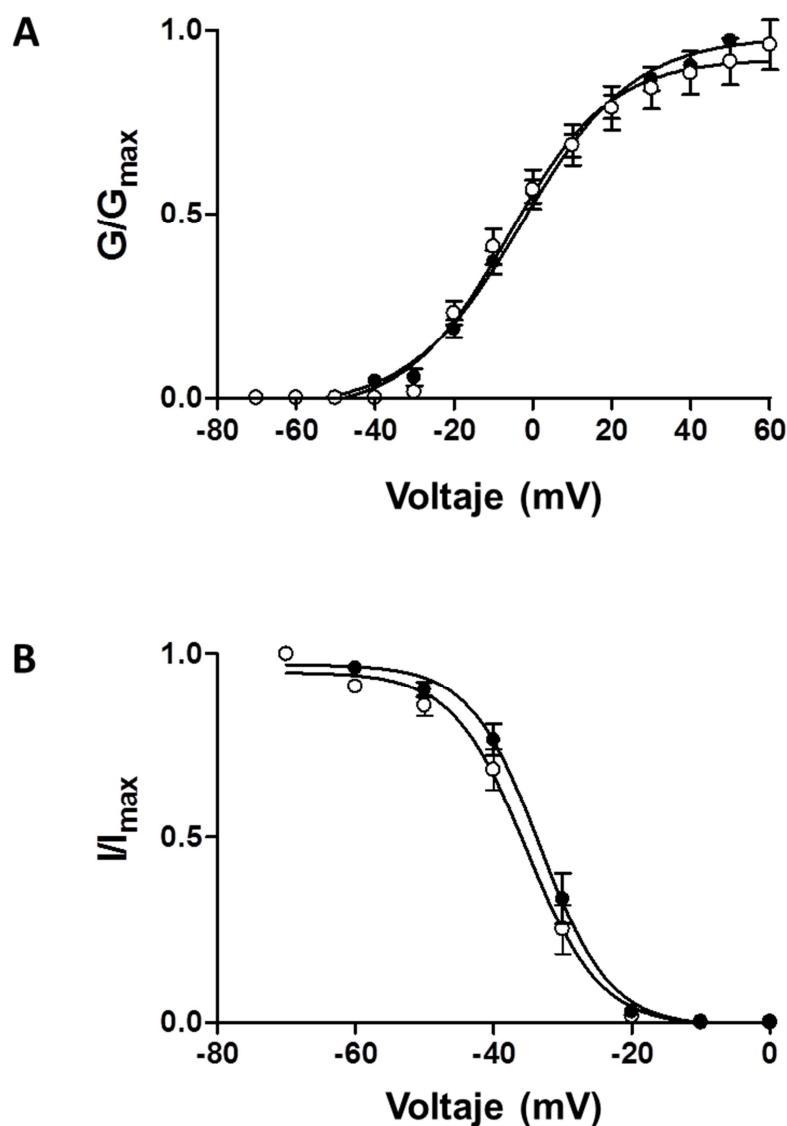


Figura 58. (A) La leptina no indujo modificaciones en la curva de activación (Control $n=7$ y Leptina $n=8$) ni (B) en la curva de inactivación de la I_{tof} (Control $n=7$ y Leptina $n=8$) Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

Además, se analizó el curso temporal de la reactivación de la I_{tof} en 5 miocitos control y 5 miocitos tratados con leptina durante 48 h. Como ilustra la figura 59, las dos constantes de tiempo de la

reactivación no fueron diferentes cuando se compararon los datos obtenidos en los miocitos control (círculos blancos) con aquellos obtenidos en los miocitos tratados con leptina (círculos negros). La τ_1 fue 0.105 ± 0.019 s en control vs. 0.071 ± 0.017 s en leptina; y τ_2 fue 0.578 ± 0.136 s en control vs. 0.486 ± 0.137 s en leptina.

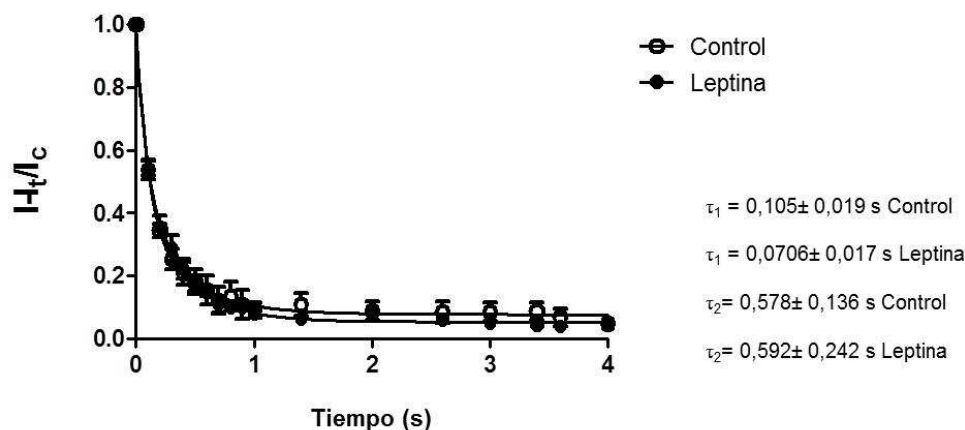


Figura 59. La leptina no indujo modificaciones en la reactivación de la I_{tof} (Control n=5 y Leptina n=5) Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

RESUMEN: El tratamiento con leptina 48 h indujo un incremento de los niveles de RNAm y de expresión proteica de los canales de potasio Kv4.2, Kv4.3 y KChIP2 así como un aumento de la amplitud y densidad de la I_{tof} , que se acompaña de un acortamiento de la duración del potencial de acción medida al 20% de la repolarización. Estos efectos de leptina no se relacionaron con cambios en la activación, inactivación y reactivación del canal.

2.4 IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE Akt EN EL EFECTO DE LEPTINA SOBRE EL REMODELADO ELÉCTRICO

Como muestra la figura 46B, leptina activa la fosforilación de la vía de Akt y, además, en estudios previos se ha demostrado que la vía de Akt puede estar implicada en la modulación de canales de K^+ [506, 507]. Por lo tanto, el siguiente paso fue analizar la implicación de esta vía en el aumento

de los componentes moleculares de la I_{to} . Para ello, los cardiomiocitos se dividieron en 4 grupos experimentales. Un grupo se trató con el vehículo durante 48 horas, otro grupo se trató con leptina a una concentración de 100 ng/mL, otro grupo se trató con el inhibidor de Akt, triciribina a una concentración de 1 μ M y finalmente otro grupo se pre-trató con el inhibidor de Akt, triciribina y posteriormente se trató con leptina 100 ng/mL durante 48 horas. Tras el tratamiento, se analizaron las expresiones proteicas de las diferentes subunidades del canal de potasio mediante la técnica de Western blot.

En la figura 60A se muestra que el incremento la expresión proteica de la subunidad Kv4.2 inducido por leptina se previno con el pre-tratamiento con triciribina. Se obtuvieron resultados similares para la subunidad Kv4.3 (figura 60B) y la subunidad reguladora KChIP2 (figura 60C). Estos datos muestran que el tratamiento con leptina regula al alza la expresión proteica de las subunidades Kv4.2, Kv4.3 y KChIP2 a través de la activación de la vía de Akt.

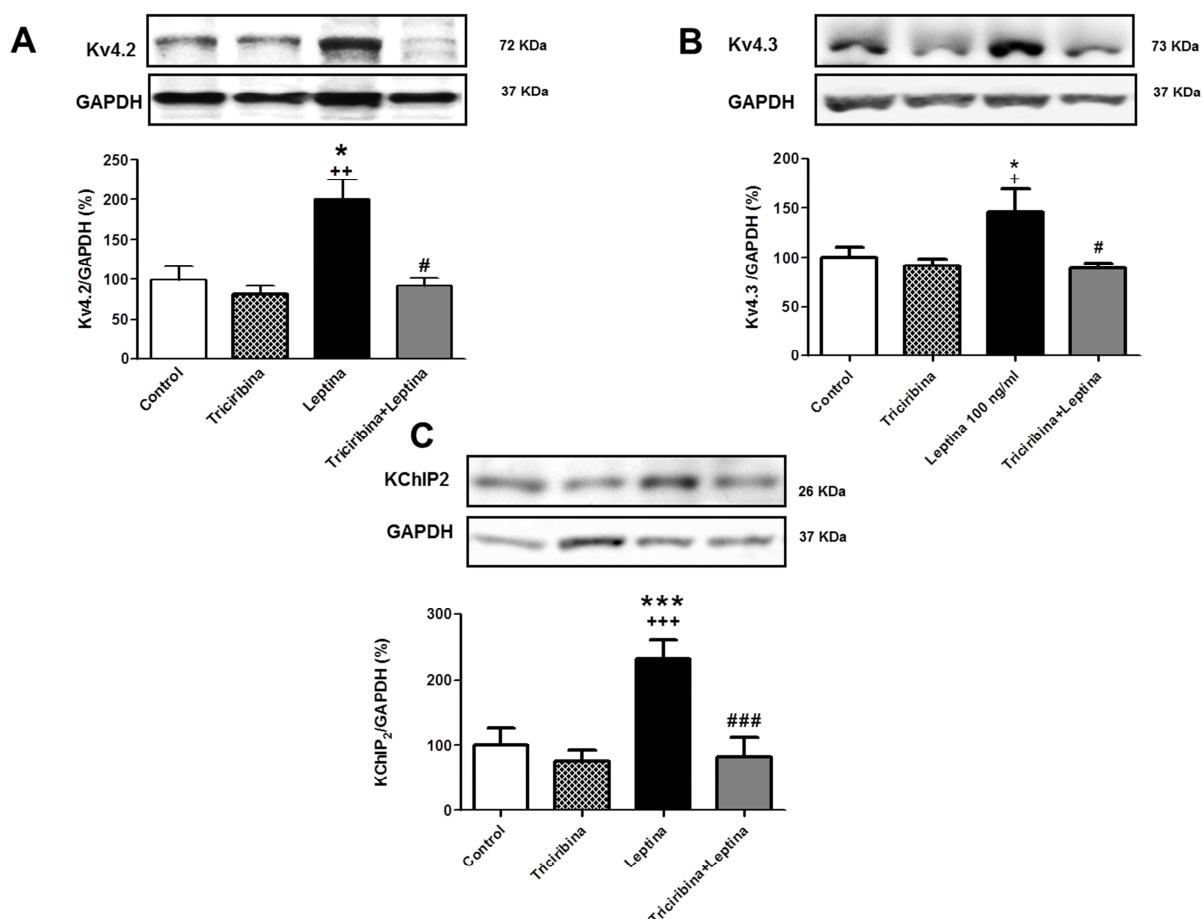


Figura 60. (A) El pre-tratamiento de los cardiomiocitos con triciribina 1 μ M previno totalmente el incremento de la expresión de Kv4.2 (n=5) de (B) Kv4.3 y (C) KChIP2. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. *P<0.05 y ***P<0.001 vs. Control; +P<0.05, ++P<0.01 y +++P<0.001 vs. triciribina y #P<0.05 y ###P<0.001 vs Leptina

Para confirmar que la activación de Akt también está implicada en la modulación de las subunidades Kv4.2 y Kv4.3, se registró la I_{tof} a +40mV en cardiomiocitos tratados con el inhibidor de Akt triciribina y en cardiomiocitos pre-tratados con triciribina y posteriormente con leptina durante 48 horas. La figura 61A muestra que los trazos obtenidos a +40 mV en un miocito tratado con triciribina y otro pre-tratado con triciribina y posteriormente con leptina fueron similares. En la figura 61B y 61C se observan los valores medios de amplitud y densidad respectivamente de la I_{tof} , obtenidos en 7 cardiomiocitos tratados solo con triciribina (histograma blanco) y en 13 cardiomiocitos pre-tratados con triciribina y posteriormente con leptina (histograma negro). En presencia de triciribina, el tratamiento con leptina no indujo ningún efecto sobre la amplitud ni

sobre la densidad de la I_{toF} en los cardiomiocitos ventriculares adultos, sugiriendo este dato una implicación de la vía de Akt en el efecto de leptina sobre la I_{toF} en los miocitos ventriculares adultos.

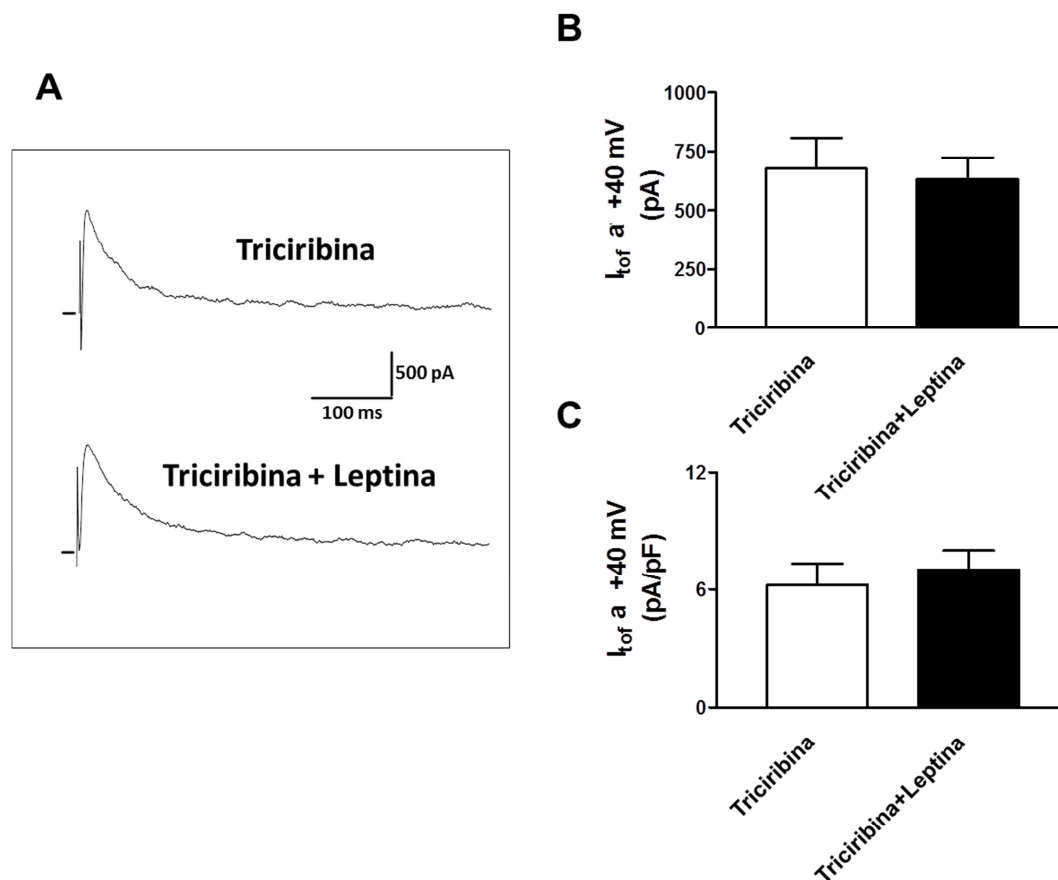


Figura 61. (A) Registro típico obtenido en un miocito tratado con triciribina y un miocito pre-tratado con triciribina y posteriormente con leptina (B) El pre-tratamiento de los cardiomiocitos con triciribina previno el incremento de la amplitud y (C) densidad de la I_{toF} a +40 mV (Triciribina n=7 y Triciribina+Leptina n=13) (Los resultados se expresan como la media \pm SEM).

RESUMEN: El incremento tanto de expresión proteica de los canales Kv4.2, Kv4.3 y KChIP2 como de la I_{toF} inducidos por el tratamiento con leptina está mediado, al menos en parte, por la vía de Akt.

3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS CARDIACOS DE LEPTINA EN UN MODELO IN VIVO

En un segundo gran grupo de experimentos se analizaron los efectos de leptina *in vivo*. Un aspecto que se tuvo en cuenta en primer lugar es el hecho bien conocido de que leptina es capaz de ejercer un aumento de la actividad simpática *in vivo* [508]. Como consecuencia, está descrito que leptina puede aumentar la presión arterial. Por lo tanto, y con la finalidad de poder estudiar los efectos cardiacos directos de leptina de forma independiente de los efectos derivados del posible incremento de la presión arterial, en la presente tesis doctoral se utilizó una dosis no hipertensiva de leptina pero que es capaz de activar la vía de STAT 3 en cardiomiocitos [96]. Se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL6J de 8 semanas de edad. Los ratones fueron tratados con leptina durante 3 semanas con una dosis de 0.36 mg/kg/día. El tratamiento se realizó mediante la implantación de bombas osmóticas de liberación sostenida, modelo 2004 (ALZET®) con una velocidad de liberación de 0.25 µl/hora.

3.1 PARAMETROS MACROSCÓPICOS

Este tratamiento con leptina no modificó el peso de los animales (figura 62A) ni tampoco la longitud de la tibia, la relación del tamaño del corazón normalizado por el peso del animal ni por la longitud de la tibia (figuras 62B, 62C y 62D respectivamente).

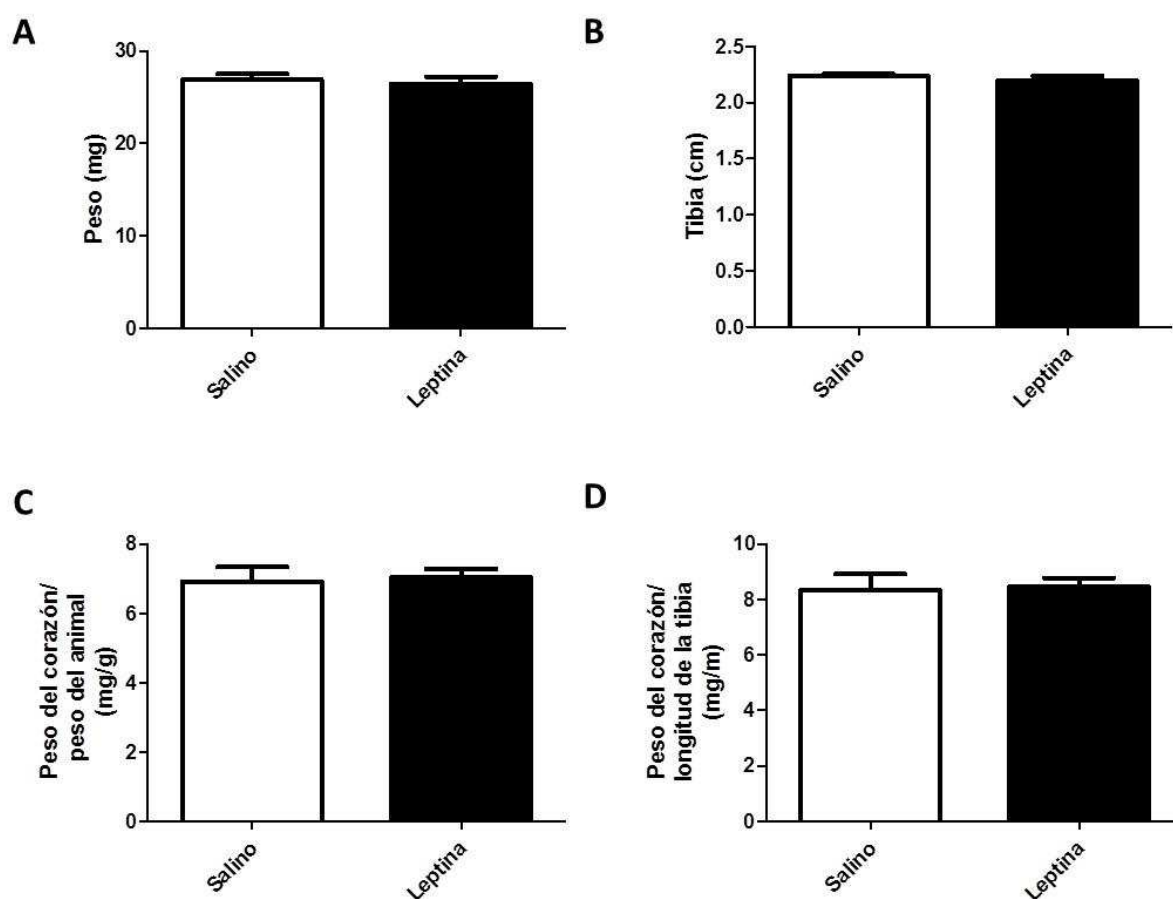


Figura 62. (A) El tratamiento con leptina durante tres semanas no indujo cambios en el peso de los animales (n=8) (B) ni en la longitud de la tibia (C) ni en el peso del corazón normalizado por el peso del animal (n=8), ni (D) en el peso del corazón normalizado por la longitud de la tibia (n=8)

3.2 ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LOS MIOCITOS

La superficie celular de los cardiomiocitos aislados de los animales controles y tratados con leptina, medida en micrómetros cuadrados, tampoco fue modificada por el tratamiento con leptina (figura 63).

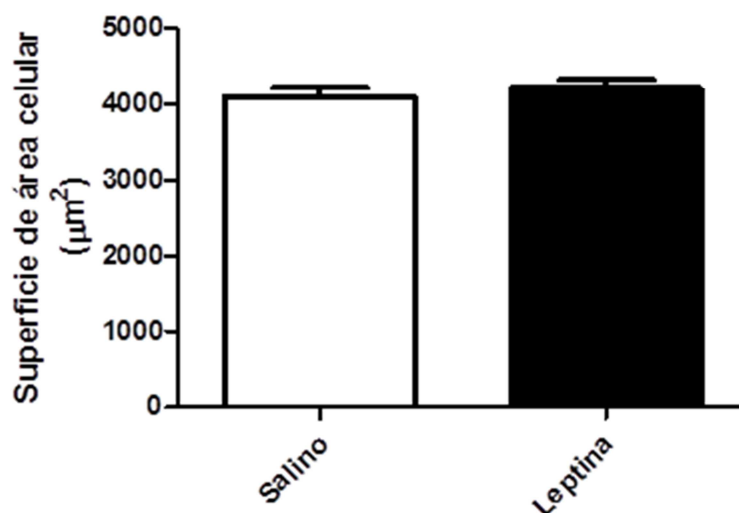


Figura 63. El tratamiento con leptina durante tres semanas no indujo cambios en la superficie celular de los cardiomiocitos aislados (n=160) Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

3.3 RECEPTORES DE LEPTINA

Tras analizar los parámetros macroscópicos, se cuantificó la expresión relativa de los receptores de leptina en los cardiomiocitos de los ratones tratados con leptina exógena durante tres semanas. Como se observa en las figuras 64A y 64B el tratamiento no indujo ninguna modificación de la expresión proteica de los receptores de leptina, tanto en la isoforma corta OB-Ra como en la larga OB-Rb

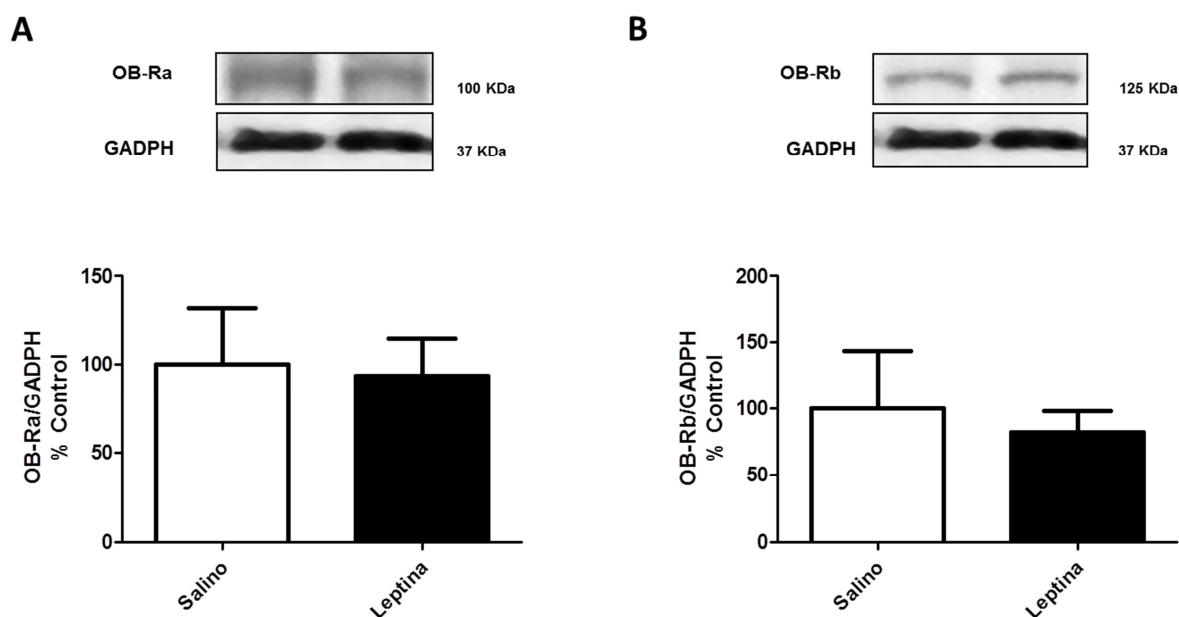


Figura 64. (A) El tratamiento con leptina durante tres semanas no indujo modificaciones en la expresión de la isoforma corta del receptor de leptina OB-Ra (n=6) (B) ni en la isoforma larga OB-Rb (n=6) Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

3.4 NIVELES CARDIACOS DE LEPTINA

En otro grupo de experimentos, se analizaron mediante ELISA los niveles cardiacos de leptina en los animales tratados con leptina y en los animales control. Como se observa en la figura 65 en los animales tratados con leptina los niveles alcanzados fueron significativamente más elevados que en los animales control (Salino 421.8 ± 22.17 pg/ μ g de extracto de proteína total vs leptina 542.4 ± 36.43 pg/ μ g de extracto de proteína total $P < 0.05$).

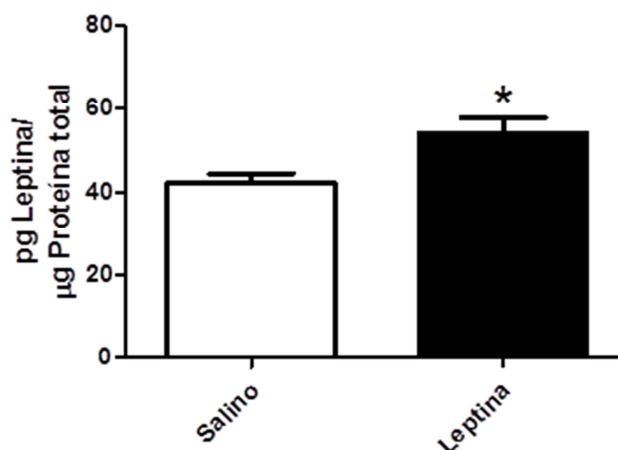


Figura 65. El tratamiento con leptina durante tres semanas indujo un incremento en los niveles de leptina miocárdicos. Los resultados se expresan como la media ± SEM. *P<0.05 vs Control

RESUMEN: El tratamiento con leptina durante 3 semanas a una dosis de 0,36 mg/kg/día no indujo cambios ni en el peso de los animales, ni en el peso del corazón. Asimismo, tampoco modificó el tamaño de los cardiomiocitos o la expresión proteica de los receptores de leptina en el corazón pero sí indujo un incremento de los niveles de leptina que se alcanzan en el miocardio

3.5 FUNCIÓN CARDIACA

Los niveles de leptina elevados pueden ser un factor de riesgo independiente para enfermedades cardiovasculares como la hipertensión o el infarto de miocardio. Por tanto, se analizó mediante ecocardiografía la función cardíaca en los animales tratados con leptina. La frecuencia cardíaca (figura 66A) no se vio modificada por el tratamiento, pero leptina produjo una disminución de la fracción de eyección y de la fracción de acortamiento como se observa en las figuras 66B y 66C. En la figura 66D se muestran ejemplos representativos de las ecocardiografías de un ratón control, al que se le implantó una bomba osmótica en la que el reservorio se llenó con solución salina y de un ratón al que se le implantó una bomba osmótica cargada con leptina. Estos resultados indican que el tratamiento con leptina es capaz de inducir una insuficiencia cardíaca moderada en los ratones.

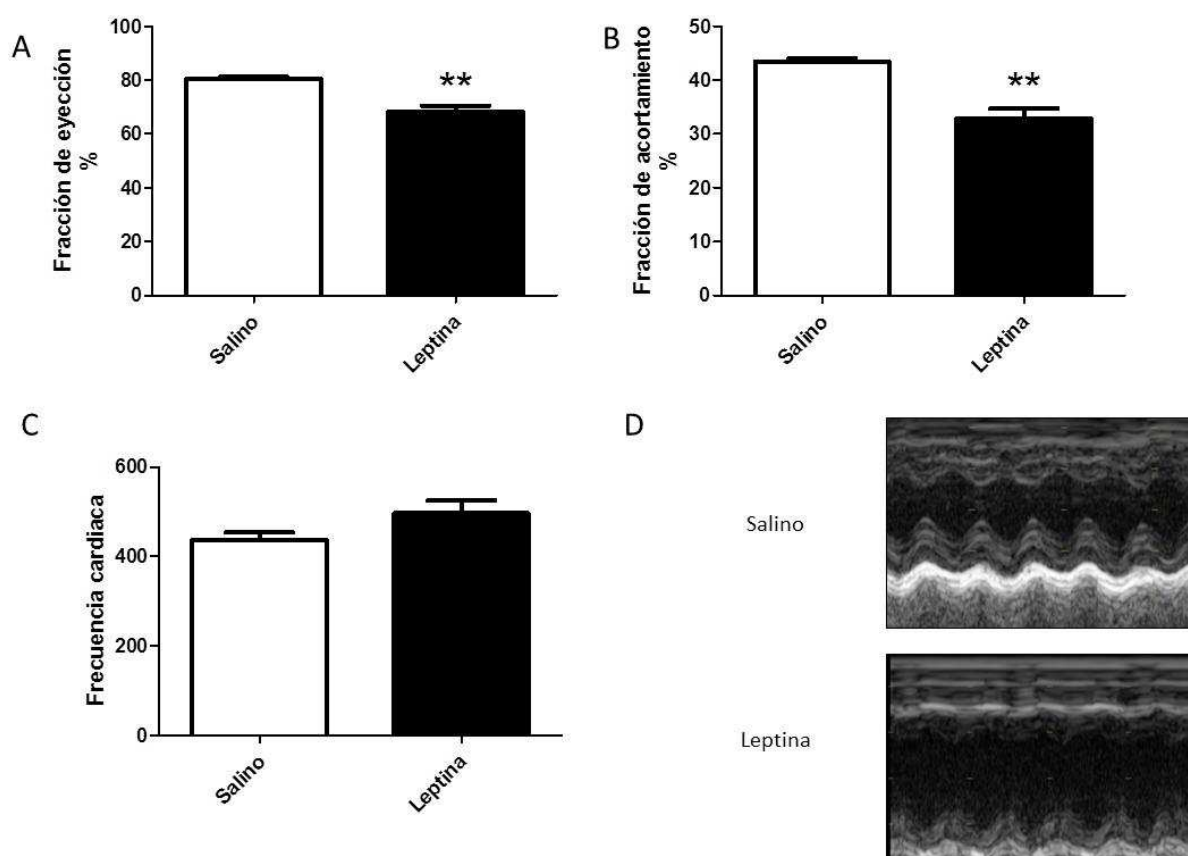


Figura 66. (A) El tratamiento con leptina durante tres semanas indujo una disminución en la fracción de eyección (B) y en la fracción de acortamiento medidos por ecocardiografía. (C) La leptina no modificó la frecuencia cardíaca. (D) Ejemplos representativos de las ecocardiografías obtenidas en un ratón tratado con salino y en otro tratado con leptina durante 3 semanas (n=4) Los resultados se expresan como la media \pm SEM. **P<0.01 vs Control

RESUMEN: El tratamiento con leptina durante 3 semanas a una dosis de 0,36 mg/kg/día es capaz de inducir una insuficiencia cardíaca moderada en el ratón

3.6 ESTUDIO DEL ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN

Con la finalidad de profundizar en los mecanismos implicados en el efecto de leptina sobre la función cardíaca se analizaron mediante microscopía confocal los movimientos de calcio intracelulares.

La homeostasis del calcio intracelular es fundamental para el mantenimiento de la correcta función contráctil de los cardiomiocitos, de tal forma que mediante el proceso de acoplamiento excitación-contracción celular se regula la contracción del músculo cardíaco. En este proceso, tienen especial relevancia los movimientos intracelulares de calcio que se analizarán a continuación, puesto que alteraciones en estos procesos dan lugar disfunciones contráctiles que desencadenaran patologías como la insuficiencia cardíaca [509].

3.6.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS TRANSITORIOS DE CALCIO

La figura 67A muestra registros de los transitorios de calcio intracelular obtenidos en dos miocitos aislados, uno de un ratón tratado con solución salina y otro tratado con leptina durante 3 semanas. En la figura 67B se observa que el tratamiento con leptina indujo un incremento significativo del tiempo al pico máximo de fluorescencia. Este parámetro da una idea de la cinética de liberación del calcio desde el retículo sarcoplásmico al citosol. Además, leptina produjo una disminución significativa de la constante de caída de la fluorescencia (τ) que da idea de la extrusión del calcio del citosol (figura 67C). El tratamiento con leptina, por tanto, fue capaz de enlentecer la salida de calcio del retículo al citosol y además de acelerar la eliminación de calcio del mismo.

En la figura 67D se puede observar que, asimismo, el tratamiento con leptina redujo la amplitud de los transitorios de calcio. Esto indica que leptina induce una disminución de la cantidad de calcio presente en el citoplasma celular durante la estimulación de la célula.

Por otro lado, y como consecuencia de esta disminución de los transitorios de calcio, leptina indujo una reducción significativa del acortamiento celular (figura 67E).

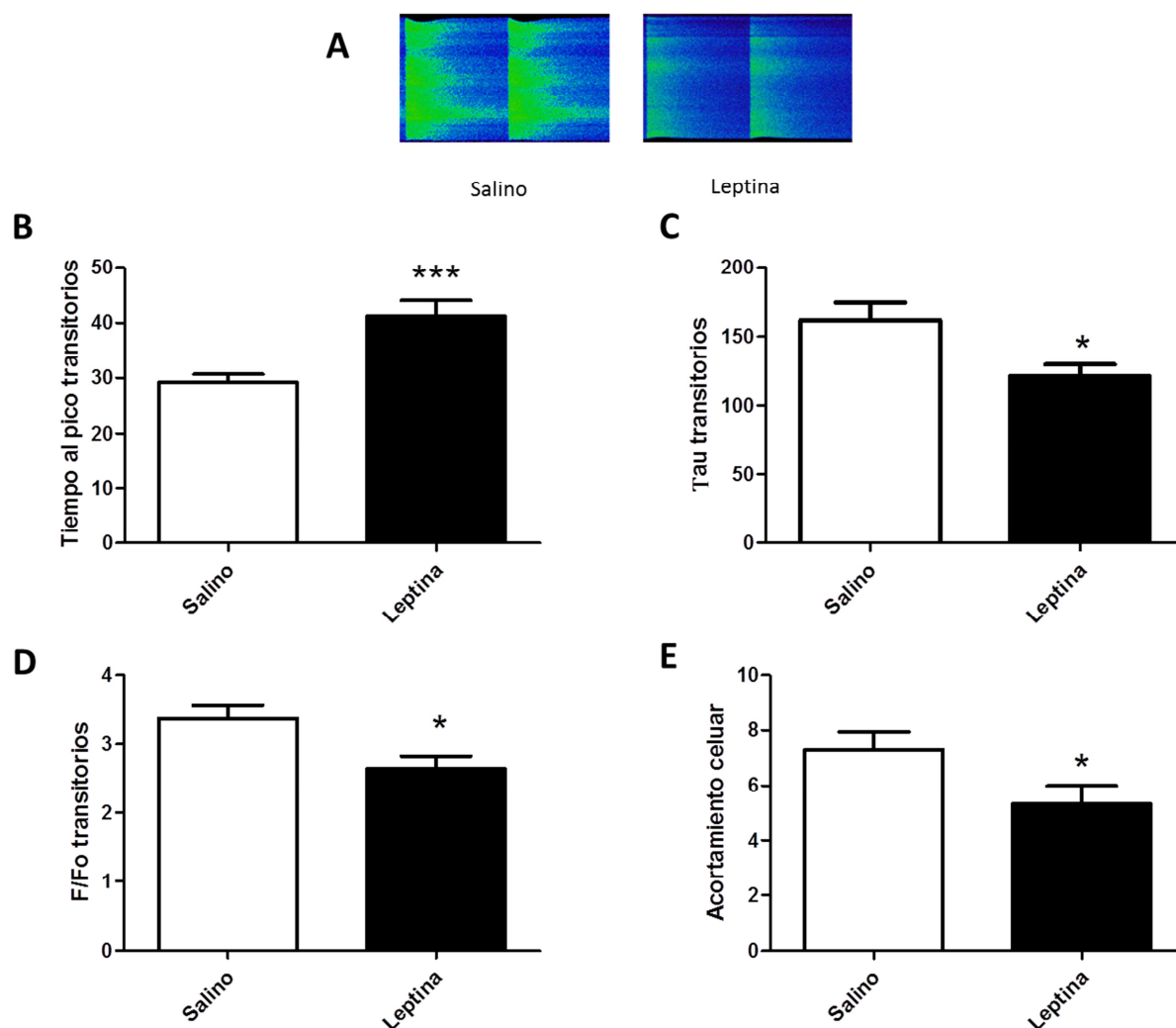


Figura 67. (A) Registro típico de transitorios de calcio obtenidos en un miocito de un ratón control y un miocito de un ratón tratado con leptina (B) El tratamiento con leptina durante tres semanas indujo un incremento del tiempo al pico de los transitorios y una disminución de (C) la constante de disminución de la fluorescencia de los transitorios (τ) de (D) la amplitud de los transitorios y (E) del acortamiento celular (Salino n=60 Leptina n=42) Los resultados se expresan como la media \pm SEM. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ vs. Control

3.6.2 ANÁLISIS DE LA CARGA DEL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO

Las alteraciones en la carga del retículo sarcoplásmico pueden dar lugar a diferencias en los transitorios de calcio, así, un aumento de la carga se relaciona con aumentos en los transitorios, pero también con una mayor ocurrencia de eventos de liberación espontánea de calcio. Sin embargo, una menor carga del retículo puede dar lugar a transitorios más pequeños [510].

Para analizar si los cambios inducidos por leptina en las concentraciones citosólicas de calcio se debían a una disminución en la carga del retículo, las células se estimularon con cafeína a una concentración de 10 mM para provocar una salida rápida del calcio desde el retículo.

La figura 68A muestra ejemplos representativos de los registros obtenidos en un miocito de un ratón tratado con solución salina y un miocito de un ratón tratado con leptina.

Como se observa en la figura 68B y 68C, la carga del retículo sarcoplásmico no se vio alterada por el tratamiento con leptina. Sin embargo, la constante de disminución de la fluorescencia se vio disminuida significativamente (figura 68D). Este dato indica que la velocidad de eliminación del calcio del citosol se encuentra aumentada, y confirma los resultados obtenidos previamente (figura 67C)

Por otra parte, leptina indujo un incremento significativo de la fluorescencia de la potenciación post-reposo de los cardiomiocitos aislados (figura 68E). Puesto que la carga del retículo fue similar en los dos grupos, esta alteración en la potenciación post-reposo podría deberse a una alteración en los eventos espontáneos de liberación de calcio desde el retículo al citosol (Sparks), por tanto, el siguiente paso fue analizar los sparks de calcio en los miocitos de los animales tratados con solución salina y los animales tratados con leptina.

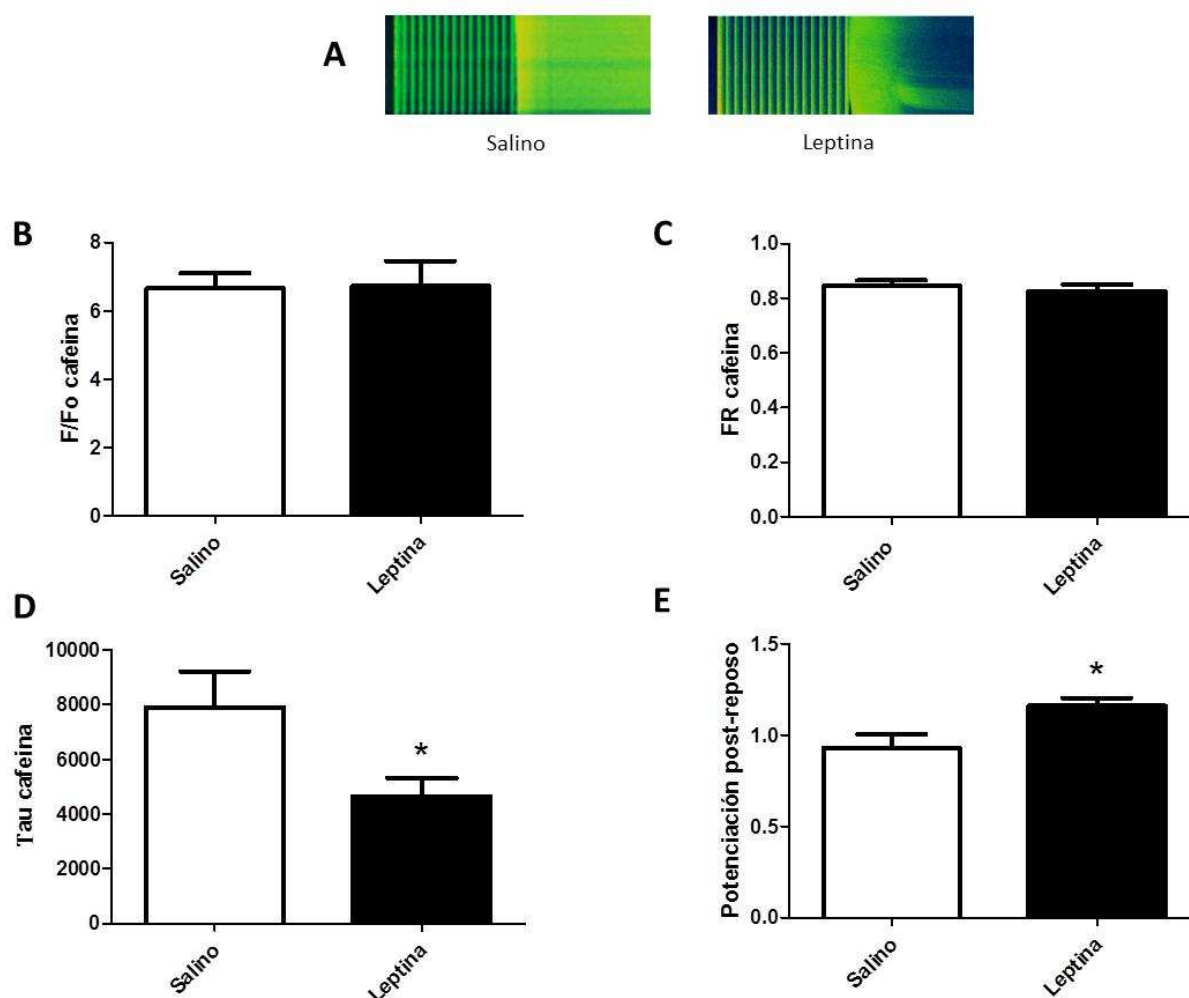


Figura 68. (A) Registro típico de la liberación masiva de calcio inducida por cafeína obtenido en un miocito de un ratón control y un miocito de un ratón tratado con leptina tras la infusión con cafeína (B) El tratamiento con leptina durante tres semanas no modificó el pico de la fluorescencia tras la infusión con cafeína ni (C) la liberación fraccional del retículo sin embargo (D) produjo una disminución de la tau de la disminución de la fluorescencia tras la infusión con cafeína y (E) un aumento de la potenciación post-reposo del tiempo al pico de los transitorios y una disminución de (Salino n=32 Leptina n=23) Los resultados se expresan como la media \pm SEM. *P<0.05 vs. Control

3.6.3ANÁLISIS DE LOS SPARKS DE CALCIO

Asimismo, se midieron las unidades básicas de liberación de calcio que se observan en la célula en reposo y que se conocen como sparks.

La figura 69A muestra ejemplos representativos de los registros de sparks obtenidos en un miocito de un ratón tratado con solución salina y un miocito de un ratón tratado con leptina.

El tratamiento con leptina no modificó la frecuencia de liberación de sparks (figura 69B), sin embargo, indujo una disminución significativa tanto en el tamaño de los sparks (figura 69C) como en su duración (figura 69D) y amplitud (figura 69E).

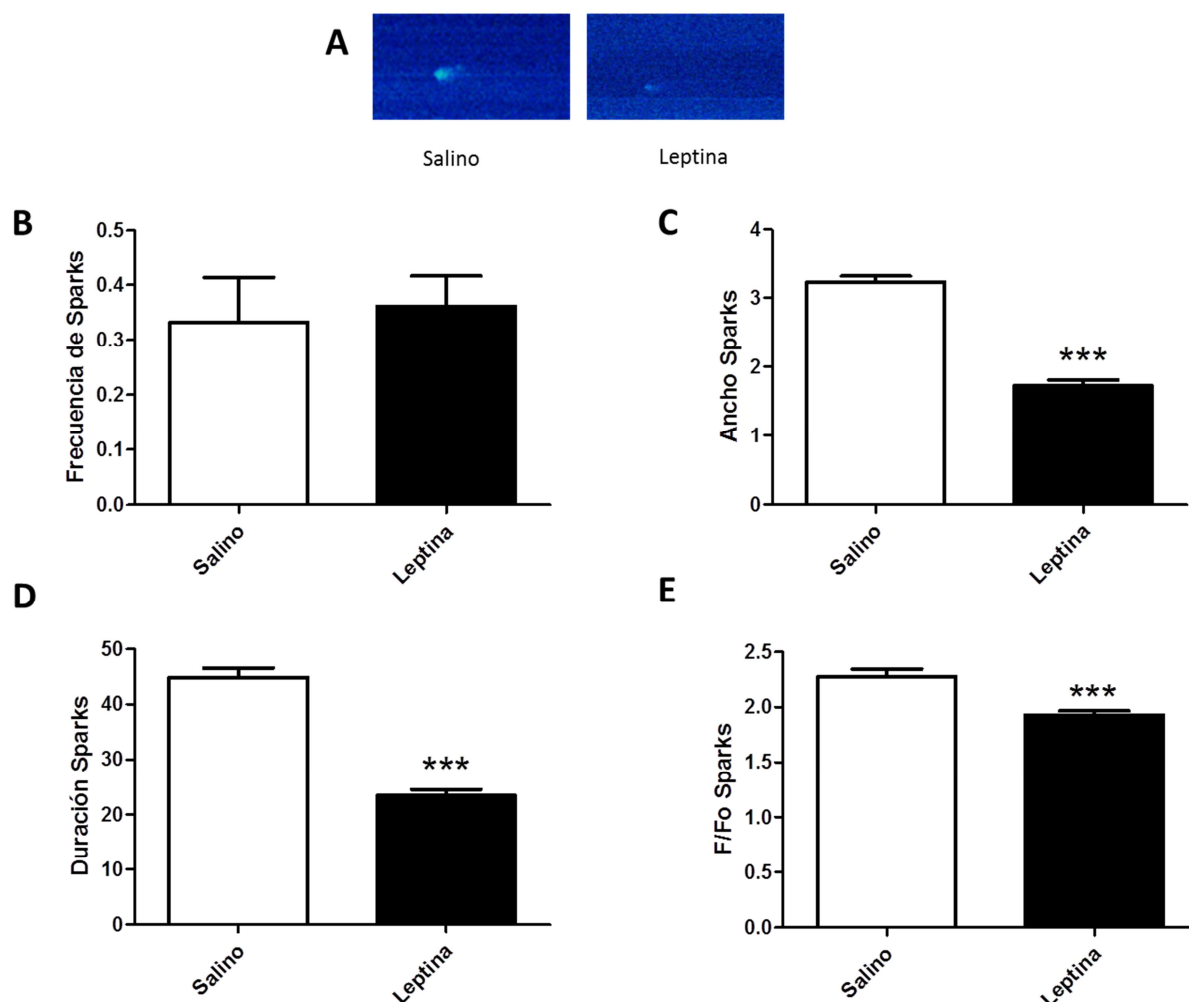


Figura 69. (A) Registro típico de los sparks obtenidos en un miocito de un ratón control y un miocito de un ratón tratado con leptina (B) El tratamiento con leptina durante tres semanas no modificó la frecuencia de los sparks pero (C) indujo una disminución en la anchura, (D) la duración y (E) la intensidad de la fluorescencia de los sparks (Salino n=46 Leptina n=37) Los resultados se expresan como la media±SEM. ***P<0.001 vs. Control

RESUMEN: El tratamiento con leptina durante 3 semanas a una dosis de 0,36 mg/kg/día indujo una disminución de la contractilidad celular debida a una disminución del calcio citosólico durante el transitorio. Esta disminución de calcio puede deberse a un enlentecimiento de la salida de calcio del retículo al citosol y a una extrusión más rápida del mismo desde el citoplasma celular.

Por otro lado la carga del retículo sarcoplásmico no se alteró. Sin embargo, igual que se observó en los transitorios (figura 67C) la constante de caída de la fluorescencia tras la infusión con cafeína se aceleró en los miocitos procedentes de los animales tratados con leptina. Además, los miocitos de los animales tratados presentaron una mayor potenciación post-reposo, esto es, la liberación de calcio debida al primer estímulo tras un estado de reposo fue mayor en los animales tratados con leptina. Esta mayor potenciación post-reposo pudo deberse a la disminución de la amplitud, duración y anchura de los sparks tras el tratamiento con leptina.

3.7 ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO

3.7.1 CORRIENTE DE CALCIO TIPO L (I_{CaL})

Se sabe que la I_{CaL} es el principal desencadenante del proceso de acoplamiento excitación-contracción [511]. Por ello se ha analizado la corriente de calcio tipo L en miocitos de ratones tratados con solución salina y en miocitos tratados de ratones tratados con leptina.

La figura 70 muestra la relación corriente-voltaje de 16 miocitos procedentes de ratones tratados con suero salino (círculos blancos) y de 17 miocitos procedentes de ratones tratados durante 3 semanas con leptina (círculos negros). El tratamiento con leptina no produjo ninguna alteración en la densidad de la I_{CaL} a ninguno de los potenciales medidos.

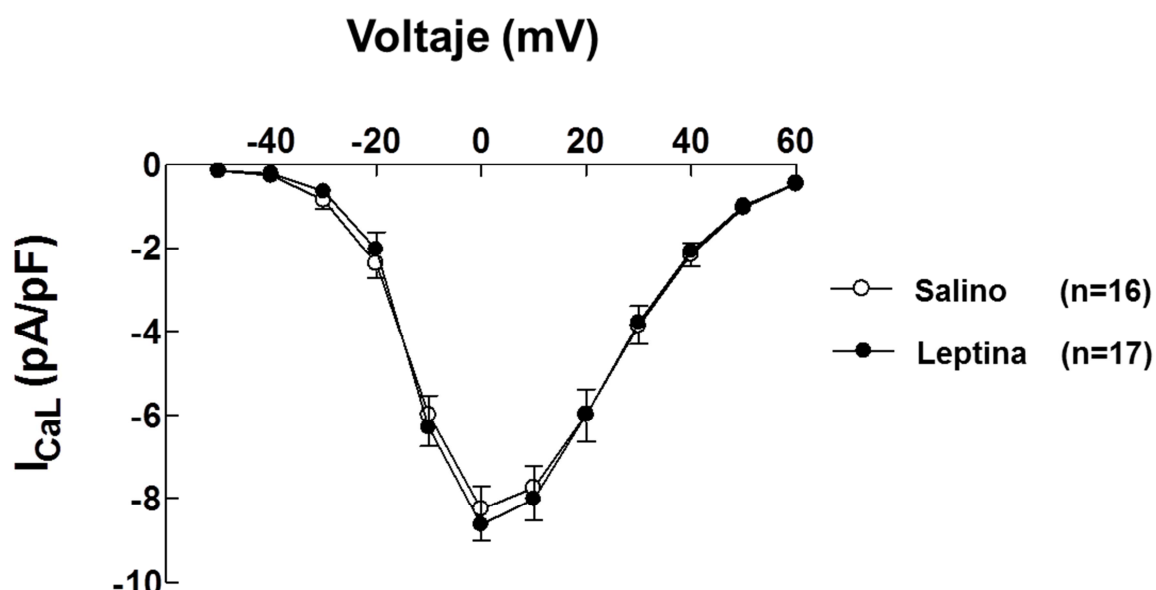


Figura 70. El tratamiento con leptina durante tres semanas no indujo modificaciones en la corriente de calcio tipo L en los cardiomiocitos (Salino n=16 Leptina n=17) Los resultados se expresan como la media \pm SEM.

3.8 INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)

En los cardiomiocitos de ratón el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es la principal proteína implicada en la extrusión de calcio desde el citosol. Puesto que los resultados de fluorescencia sugieren una salida de calcio más rápida del citosol en los ratones tratados de forma crónica con leptina se analizaron los niveles de expresión del intercambiador sodio-calcio (NCX) en nuestro modelo.

La figura 71 muestra que el tratamiento con leptina durante tres semanas indujo un incremento significativo de la expresión del intercambiador sodio-calcio, sugiriendo que esta proteína puede ser una de las responsables de la rápida eliminación de calcio del citosol.

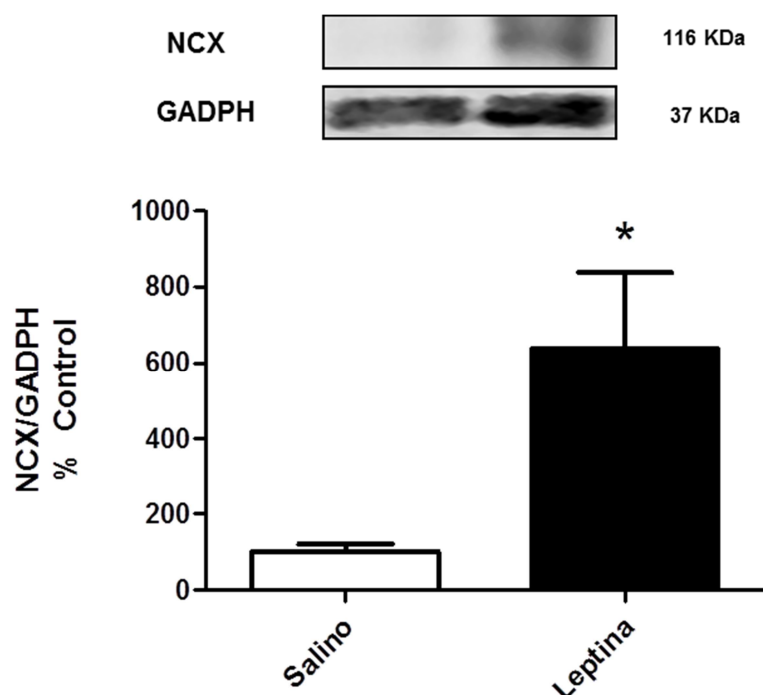


Figura 71. El tratamiento con leptina durante tres semanas un incremento de la expresión proteica del intercambiador sodio-calcio (n=6) Los resultados se expresan como la media \pm SEM. *P<0.05

3.9 NIVELES DE FOSFORILACIÓN DEL FOSFOLAMBANO (PLB)

Una vez finalizado el proceso contráctil, el calcio que se ha movilizado en el interior celular debe retornar a su lugar de origen. Para ello, la célula cuenta con el NCX pero además tiene otros mecanismos como la bomba de calcio del retículo (SERCA). La SERCA es la principal encargada de recaptar el calcio que salió del retículo de nuevo al interior del mismo y como consecuencia es un mecanismo fundamental en el comienzo de la diástole.

Por lo tanto, se analizó la posible contribución de la SERCA a los cambios en la cinética de eliminación del calcio del citosol en nuestros miocitos. Para ello se determinó la fosforilación de uno de sus principales reguladores, el fosfolambano (PLB) [512].

El tratamiento con leptina durante tres semanas no indujo ninguna modificación en los niveles de fosforilación del fosfolambano como se observa en la figura 72A y 72B, sugiriendo que la SERCA no estaría implicada en los efectos de leptina sobre los movimientos de calcio intracelular. Estos

datos son consistentes con el hecho de que la carga del retículo sarcoplásmico no se vio alterada por el tratamiento.

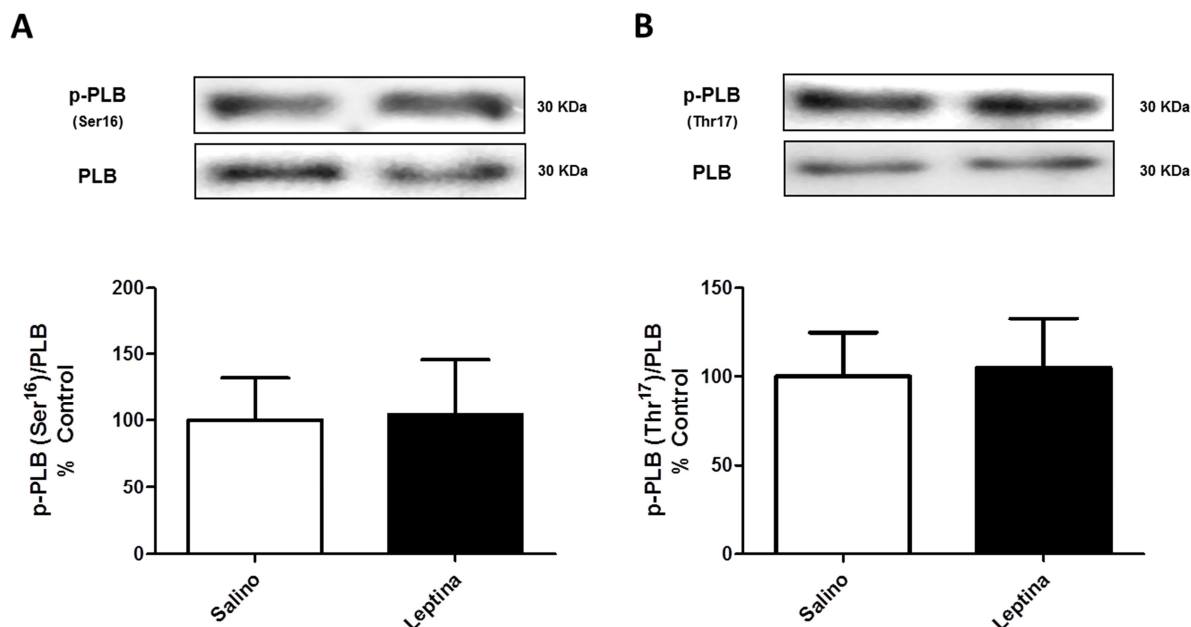


Figura 72. (A) El tratamiento con leptina durante tres semanas no modificó los niveles de fosforilación del PLB ni en la serina 16 ni (B) en la treonina 17 (n=6) Los resultados se expresan como la media±SEM.

3.10 CANAL DE RIANODINA

La teoría del control local del calcio [435] postula que cuando se abre un canal de Ca^{2+} tipo L, el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ local activa un pequeño grupo (cluster) de RyR produciendo un spark de Ca^{2+} . Sin embargo, durante el estado de reposo de la célula, los RyR pueden abrirse de forma espontánea incluso en ausencia de I_{CaL} [441] dando lugar a la liberación de sparks.

Los RyR se activan mediante fosforilación en varios residuos de Serina, en concreto, se fosforila en el residuo 2815 por la CaMKII y en la Ser 2808 por la PKA. Además, en los últimos años se ha descrito otra fosforilación en la Ser 2030 modulada por PKA [469, 513, 514]. Modificaciones en la fosforilación de la RyR pueden dar lugar a una cinética alterada del mismo.

Puesto que previamente habíamos observado una disminución en el tamaño, duración y amplitud de los sparks, analizamos los niveles de fosforilación de los receptores de rianodina en la Serina 2808, y en la Serina 2815. El tratamiento con leptina durante tres semanas indujo un incremento significativo de la fosforilación en la Serina 2808 (Figura 73A) pero no indujo ninguna modificación en los niveles de fosforilación de la Serina 2815 (Figura 73B).

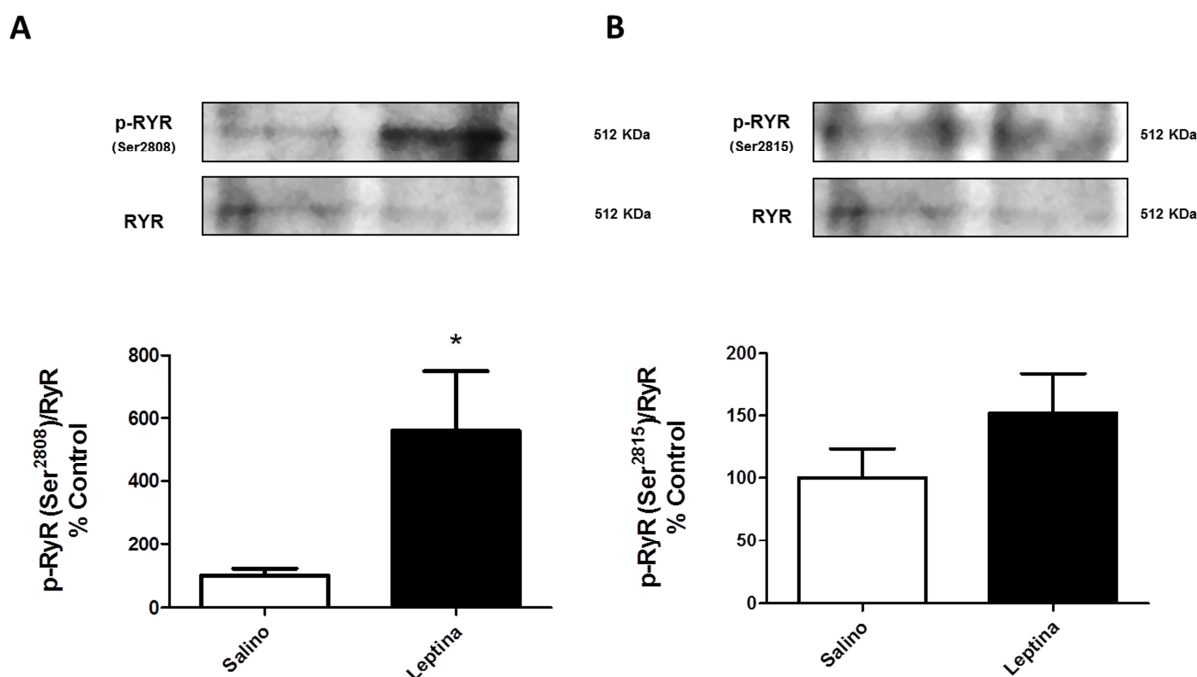


Figura 73. (A) El tratamiento con leptina durante tres semanas indujo un aumento en los niveles de fosforilación del canal de Ryanodina en la serina 2808 pero no (B) en la serina 2815 (n=6) Los resultados se expresan como la media±SEM. *P<0.05

RESUMEN: El tratamiento con leptina durante 3 semanas a una dosis de 0,36 mg/kg/día indujo un incremento de los niveles proteicos de NCX. Este dato es consistente con la salida más rápida de calcio del citosol observada por fluorescencia. Sin embargo, el tratamiento no modificó la actividad del fosfolambano y por lo tanto, la actividad de la SERCA manteniéndose así la carga de retículo sarcoplásmico. Por otro lado, leptina indujo un incremento de la fosforilación de la rianodina en el sitio de la PKA. Este aumento de la fosforilación de la rianodina podría ser el mecanismo responsable de la modificación de la cinética del canal por el cual el calcio sale de forma más lenta desde el retículo al citosol durante la contracción cardíaca. Asimismo, este mecanismo puede dar

lugar a estados de subconductancias, de tal forma que puede ser una de las causas de la disminución del tamaño de los sparks de calcio observados durante el estado de reposo de los miocitos cardiacos.

3.11 POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS EN EL EFECTO INOTRÓPICO NEGATIVO DE LEPTINA

3.11.1 POSIBLE IMPLICACIÓN DE eNOS

Un incremento en los niveles de NO intracelulares produce una disminución de la contractilidad miocárdica [515-518], sin embargo, también se ha descrito que el NO puede inducir un efecto inotrópico positivo de forma aguda [519]. Se ha postulado que esta discrepancia se debe a un efecto bifásico del NO. Así, bajas concentraciones de NO dan lugar a un efecto inotrópico positivo y concentraciones más altas inducirían un efecto inotrópico negativo [520].

El NO se genera por una familia de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS) de las que se han descrito 3 isoformas. De ellas la NOS1 ó nNOS y la NOS3 o eNOS se expresan de forma constitutiva en el tejido miocárdico mientras que la NOS2 o iNOS es una isoforma inducible [521]. Entre ellas, la que se expresa mayoritariamente en los miocitos es la NOS3 o eNOS [522]. Nickola y cols. (2000) han descrito un efecto inotrópico negativo de leptina en cardiomiocitos aislados. En dicho estudio, se mostró que leptina era capaz de activar eNOS, proponiéndose la vía del óxido nítrico como la principal responsable del efecto depresor de leptina sobre la contracción [152]. Basándonos en dicho estudio, analizamos el efecto del tratamiento crónico con leptina sobre la fosforilación de eNOS en cardiomiocitos aislados de animales controles y tratados con leptina. La figura 74, muestra un incremento significativo de la fosforilación de eNOS en aquellos cardiomiocitos procedentes de los animales tratados con leptina

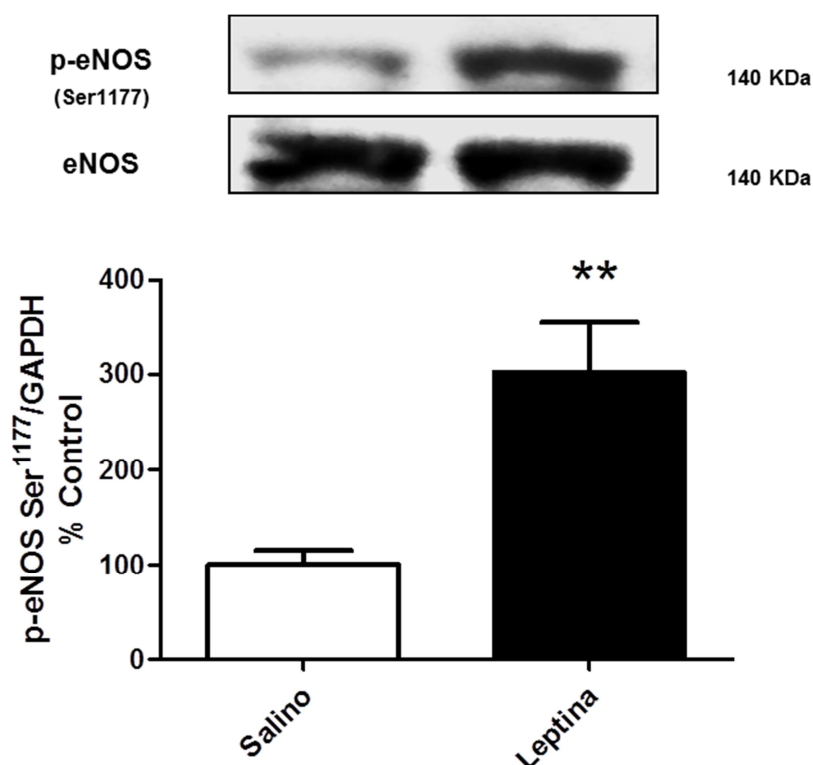


Figura 74. El tratamiento con leptina durante tres semanas indujo un aumento en los niveles de fosforilación de la eNOS (n=6). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. **P<0.01

La actividad de eNOS puede regularse por desacetilación de residuos de lisinas en el dominio de unión a la calmodulina [523]. Además, existen evidencias de que leptina es capaz de aumentar la expresión de la desacetilasa sirtuina-1 (SIRT-1) [524]. Por todo ello, probamos la hipótesis de que leptina a través de la activación de SIRT-1 pudiera estar participando en la activación de eNOS en los cardiomiocitos. Para ello, en otro grupo de experimentos se analizó en primer lugar la expresión de SIRT-1 en los miocitos procedentes de los animales tratados con leptina y de los animales control.

Como se observa en la figura 75A, el tratamiento con leptina durante tres semanas indujo un incremento en la expresión proteica de SIRT-1.

Con la finalidad de comprobar si el aumento de la expresión de SIRT-1 inducido por leptina podría participar en el aumento de la actividad de eNOS, realizamos un ensayo de inmunoprecipitación

para analizar el porcentaje relativo de lisinas acetiladas en presencia de leptina. En primer lugar se inmunoprecipitó eNOS y luego se analizaron las lisinas acetiladas y se normalizaron por la cantidad de eNOS inmunoprecipitada en cada muestra. En la figura 75B se puede observar que los animales tratados con leptina el porcentaje de eNOS acetilada es significativamente menor que en los animales controles, esta menor acetilación corresponde con una mayor actividad de la eNOS y sugiere una implicación de SIRT-1 en este efecto.

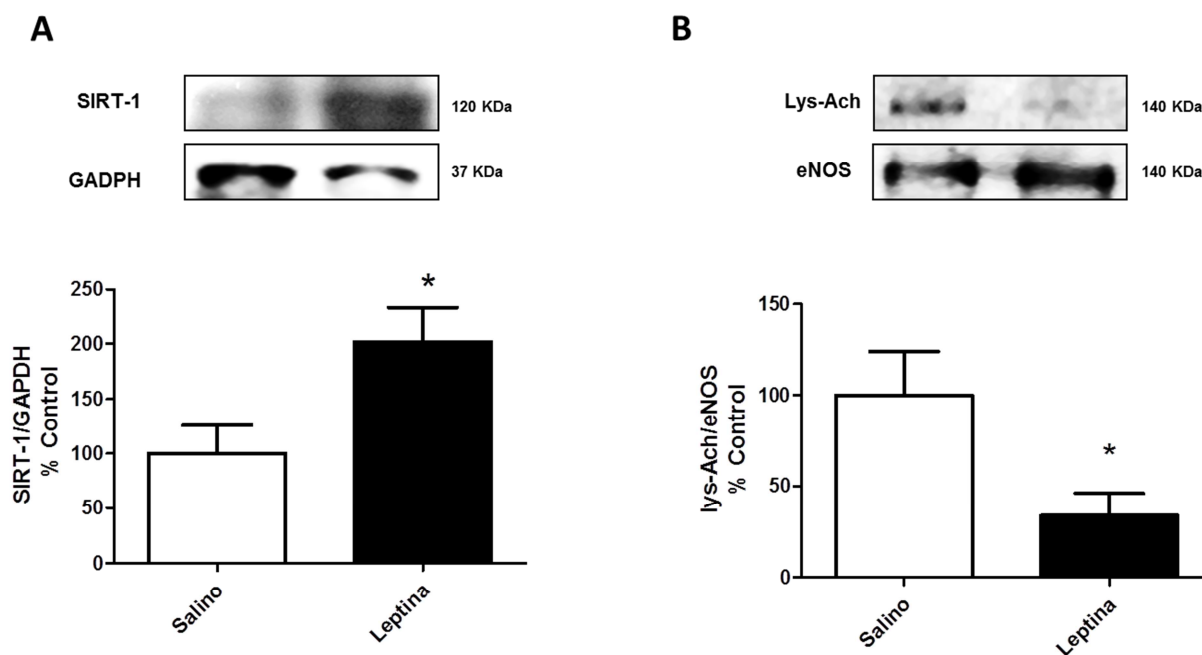


Figura 75. El tratamiento con leptina durante tres semanas indujo un incremento en los niveles de expresión proteica de la desacetilasa SIRT-1 (n=6) y (B) una disminución de la acetilación en la eNOS (n=4) Los resultados se expresan como la media \pm SEM. *P<0.05

RESUMEN: El tratamiento con leptina durante 3 semanas a una dosis de 0,36 mg/kg/día indujo un incremento de la fosforilación de la eNOS en los cardiomiocitos aislados de los animales tratados. Asimismo indujo un incremento de la expresión de la desacetilasa SIRT-1 que se correspondió con una disminución de la acetilación de la eNOS en los residuos lisina. Esta activación de la eNOS por SIRT-1 podría traducirse en un incremento de los niveles de NO y por lo tanto, y podría ser uno de los mecanismos implicados en la disminución de la contractilidad de los cardiomiocitos observada en los animales tratados con leptina.

DISCUSIÓN

1. EFFECTO PRO-HIPERTRÓFICO DE LEPTINA

En el momento de iniciarse la presente Tesis Doctoral, la principal evidencia del efecto pro-hipertrófico de leptina *in vitro* procedía de estudios que habían examinado el efecto directo de leptina en preparaciones de miocitos neonatales o pediátricos (Ver Tabla 1). En nuestro estudio hemos demostrado por primera vez que leptina también es capaz de inducir hipertrofia en los cardiomiocitos adultos.

Los niveles plasmáticos de leptina en sujetos normopeso oscilan entre 5-15 ng/ml, mientras que en individuos obesos se encuentran significativamente elevados, alcanzando valores entre 15-500 ng/ml. La hiperleptinemia frecuentemente se asocia con un aumento de la masa del ventrículo izquierdo [8, 525, 526]. Más aún, distintos estudios han demostrado una correlación positiva entre niveles de leptina y la masa del ventrículo izquierdo medida mediante ecocardiografía [8] o resonancia magnética nuclear [525] en individuos obesos o con sobrepeso pero normotensos. Estos resultados apoyan la idea de que leptina podría contribuir de forma independiente al desarrollo de la hipertrofia ventricular izquierda en humanos. Por otro lado, se han detectado niveles elevados de leptina en ausencia de obesidad en pacientes con cardiopatía isquémica [527] y con insuficiencia cardíaca [528], postulándose que los niveles elevados de leptina podrían ser un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares graves como la insuficiencia cardíaca y el infarto de miocardio [529].

A pesar de la amplia evidencia que apoya el efecto prohipertrófico de leptina, es posible dada la gran diversidad de efectos inducidos por el péptido, que bajo ciertas circunstancias, leptina pudiera ejercer otros efectos. Este es el caso de los resultados publicados por Barouch y cols. [99] utilizando un modelo de ratones deficientes para leptina (ob/ob). Los ratones ob/ob desarrollan hipertrofia del ventrículo izquierdo. Estos investigadores mostraron que la infusión de leptina en estos ratones era capaz de ejercer un efecto antihipertrófico. Se deberían hacer distintas consideraciones a estos resultados. En primer lugar habría que tener presente que la presencia de hipertrofia cardíaca en estos animales puede no ser el resultado de la ausencia de leptina por sí misma, sino más bien el resultado de alteraciones sistémicas. Además, el efecto antihipertrófico observado al infundir leptina, no implica necesariamente un efecto directo sobre los cardiomiocitos. Por otra parte, el modelo ob/ob muestra algunas características únicas que no se observan en otros modelos de

obesidad en roedores o en la obesidad humana. Por ejemplo, la presencia de obesidad suele ir acompañada de un aumento de los niveles plasmáticos de leptina [526] y por tanto un modelo con deficiencia de leptina no reflejaría las alteraciones observadas en la obesidad humana. Por otro lado, los animales ob/ob presentan valores bajos de presión arterial mientras que suele observarse lo contrario en la mayoría de los modelos de obesidad en roedores y en humanos [530].

En la presente tesis doctoral, hemos analizado el efecto pro-hipertrofico de leptina en cardiomiocitos ventriculares adultos. Hemos demostrado, que 48 horas de incubación con 100 ng/ml de leptina aumenta de forma significativa la superficie celular y la capacidad de membrana. Además, también hemos demostrado que leptina es capaz de regular al alza la expresión génica de SKA y β -MHC 2, 2 genes fetales que frecuentemente se encuentran elevados en modelos experimentales de hipertrofia cardiaca [289, 365, 367, 370]. Hay que indicar también, que en un estudio utilizando cardiomiocitos neonatales de rata, se ha postulado que leptina no solo sería capaz de aumentar la expresión de β -MHC sino también de regular al alza la expresión génica de ANP otro gen frecuentemente elevado en el ventrículo hipertrofico [96]. Los resultados de nuestro estudio mostraron que la expresión génica de ANP no fue modificada. Las razones para esta discrepancia podrían tener relación con el uso de cardiomiocitos ventriculares adultos en lugar de células neonatales no diferenciadas. De hecho, el ARNm para ANP se expresa sobre todo en la aurícula de roedores adultos, mientras que en el embrión de los roedores los niveles de mayor expresión de ANP se encuentran en el ventrículo [531].

Una de las vías que más interés ha suscitado en los últimos años en cuanto a su implicación en los procesos de hipertrofia cardiaca es la vía de PI3K. La PI3K(p110 α) es una lípido quinasa que fosforila lípidos en la membrana plasmática y da lugar a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) [532]. El PIP3 a continuación activa varias cascadas de señalización, entre las que se encuentra la proteína serina-treonina quinasa Akt o PKB [533]. Diversos estudios en ratones han confirmado que la activación de la vía de PI3K-Akt es esencial para el crecimiento celular basal en el corazón y para la hipertrofia cardiaca fisiológica [289, 293, 294].

También hemos demostrado que leptina induce la activación de la vía de Akt en cardiomiocitos ventriculares adultos y que la inhibición farmacológica de esta vía de señalización previene la hipertrofia inducida por el tratamiento con leptina en los cardiomiocitos adultos.

Está establecido que la Akt activa puede fosforilar varias dianas entre las que se encuentra mTOR (de sus siglas en inglés mammalian target of rapamycin). mTOR a su vez induce cambios en la transcripción génica que favorecen el crecimiento celular [136, 137]. Tanto mTOR como su principal diana p70S6K también se han estudiado con frecuencia en relación a la hipertrofia cardíaca [294, 534-536].

Hemos observado que la p70S6K se activa por el tratamiento con leptina en cardiomiocitos adultos de rata. Además, la inhibición farmacológica de esta vía con rapamicina previene la hipertrofia de los cardiomiocitos inducida por leptina. Estos datos son consistentes con los observados en un estudio previo en cardiomiocitos neonatales tratados con leptina [93].

Por otro lado, también se sabe que la activación de la señalización por ERK1/2 puede jugar un papel muy importante en la hipertrofia cardíaca [537, 538]. Hemos demostrado, por tanto, que leptina activa la vía de ERK1/2 en cardiomiocitos ventriculares adultos y que la inhibición farmacológica de esta vía también reduce la hipertrofia de los cardiomiocitos inducida por el tratamiento con leptina. Además, en consonancia con estudios previos [493], nuestros resultados muestran que la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 en situación basal activa la vía de Akt. Hemos observado que cuando se inhibe ERK1/2 por debajo de la actividad basal, se produce hipertrofia de los cardiomiocitos y este efecto parece estar modulado por la activación de Akt, puesto que un pre-tratamiento de las células con un inhibidor de Akt, en células en las que ERK presenta una actividad por debajo de los niveles basales, previene la hipertrofia de los cardiomiocitos inducida por la inhibición de ERK.

En cuanto a la relación entre las vías de ERK1/2 y Akt, también se sabe que la activación de Akt puede activar la vía de ERK1/2 [493]. En nuestro estudio hemos observado que la activación de ERK1/2 inducida por leptina requiere una activación previa de la Akt en cardiomiocitos ventriculares adultos.

Sin embargo, también podrían estar implicadas otras vías de señalización en el efecto pro-hipertrófico inducido por leptina en cardiomiocitos ventriculares adultos. En este sentido, se ha descrito que la vía de endotelina, la producción de especies reactivas de oxígeno [90] la GTPasa de

bajo peso molecular RhoA [92] y la MAPK p38 [88] entre otras pueden estar implicadas en los efectos pro-hipertróficos de leptina observados *in vitro*.

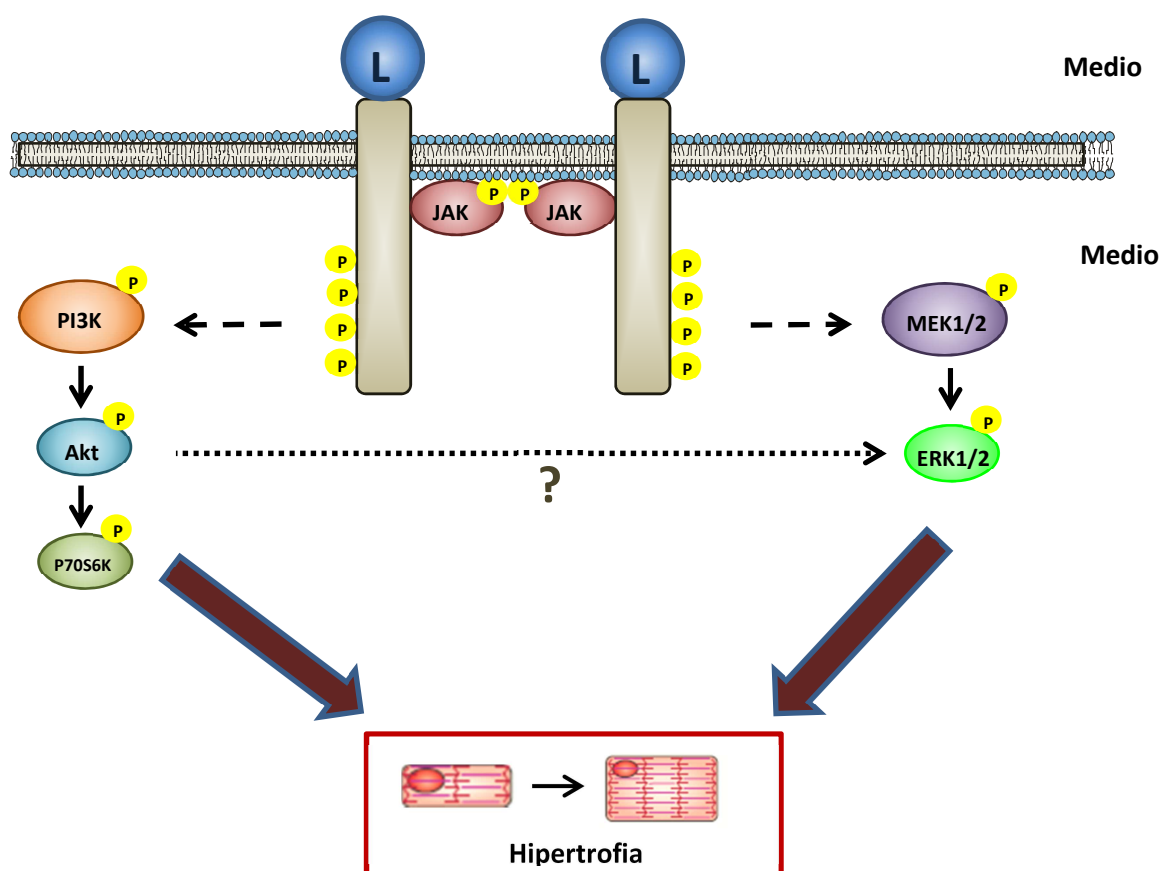


Figura 76. Esquema de los posibles mecanismos implicados en el efecto pro-hipertrófico de leptina. Leptina a través de la activación de las vías de Akt y ERK1/2 induce hipertrofia en cardiomiocitos ventriculares adultos.

2. EFECTO DE LEPTINA SOBRE EL REMODELADO DE LOS CANALES IÓNICOS CARDIACOS

Está bien establecido que la alteración de canales de potasio es una de las principales causas del remodelado electrofisiológico del corazón patológico. Se ha demostrado que la I_{toF} , que juega un papel muy importante en la fase inicial de repolarización del potencial de acción [497], se regula a la baja en muchos modelos de hipertrofia del ventrículo izquierdo y en insuficiencia cardiaca [391, 392, 498].

Además del remodelado de la I_{tof} , se ha descrito una regulación a la baja de la corriente de entrada rectificadora de potasio I_{K1} , tanto en la hipertrofia cardíaca como en la insuficiencia [495, 498]. Esta corriente juega un papel importante en la fase final de la repolarización y en el mantenimiento de la estabilidad del potencial del reposo del ventrículo.

La corriente de calcio tipo L (I_{CaL}) es la principal fuente de entrada de calcio en los miocitos cardíacos, contribuye a la fase de meseta del potencial de acción y es crítica para el disparo del proceso de excitación-contracción cardíaco. Estudios de esta corriente en miocitos de corazones insuficientes han arrojado diferentes resultados, unos estudios no han mostrado cambios [502, 503] mientras que en otros se ha observado una disminución [500, 501]. Además, los canales de calcio tipo T presentes en los cardiomiocitos del ventrículo del neonato y en las células marcapasos no se detectan en miocitos ventriculares adultos. Sin embargo, pueden re-expresarse en situaciones de patología como tras un infarto de miocardio o en la hipertrofia ventricular izquierda [393, 504].

Los resultados de la presente tesis doctoral muestran que los niveles de ARNm y de expresión proteica de Kv4.2 y Kv4.3, las subunidades α responsables de I_{tof} en la rata, se regulan al alza en cardiomiocitos tratados con leptina. Además, los niveles de ARNm de la subunidad auxiliar del canal KChIP2, que es esencial en la regulación de la expresión del canal de la I_{tof} en la superficie celular, también se incrementa en los miocitos tratados con leptina. Sin embargo, el tratamiento con leptina no modifica la expresión génica de otros canales iónicos cardíacos implicados en la fase de repolarización del potencial de acción cardíaco, como son el Kir2.1, Cav1.2 o Cav3.1, resultando el efecto de leptina selectivo de las subunidades del canal de potasio que codifican para la I_{to} .

Asimismo, la expresión proteica de las subunidades α Kv4.2 y Kv4.3 y de la subunidad auxiliar KChIP2 también se encuentra aumentada en los miocitos tratados con leptina. Como resultado de este incremento de la expresión proteica de Kv4.2, Kv4.3 y KChIP2, leptina incrementa la amplitud y densidad de I_{tof} y produce una disminución de la duración del PA sin modificar las propiedades de activación o inactivación. Así pues, nuestros resultados moleculares se relacionan con los cambios funcionales observados.

Como se ha descrito previamente, leptina puede incrementar la fosforilación de Akt en los miocitos ventriculares adultos y nuestros datos muestran que la inhibición farmacológica de esta vía previene la regulación al alza de los canales de I_{toF} inducida por leptina.

En la presente tesis doctoral hemos demostrado que la regulación al alza de las subunidades α Kv4.2 y Kv4.3 y de la subunidad β KChIP2 inducidas por leptina se correlaciona con la regulación al alza de los niveles de ARNm. Por lo tanto una regulación transcripcional parece un mecanismo plausible. Además, hemos demostrado que la vía de Akt está implicada en este mecanismo, ya que la inhibición farmacológica de esta vía previene el aumento de los niveles de ARNm y proteicos de las subunidades que codifican para el canal de I_{toF} así como el aumento en la amplitud y densidad de dicha corriente.

Se sabe que la señalización por Akt está implicada en la regulación de la síntesis proteica y en la citoprotección en miocitos cardiacos [292]. En ratones transgénicos se ha confirmado que la vía de Akt es esencial tanto para el crecimiento fisiológico de los miocitos como para el desarrollo de hipertrofia fisiológica [292]. Además, varios estudios [506, 507] aunque no todos [505] han postulado que la activación de Akt inducida por el ejercicio físico podría mejorar el remodelado eléctrico patológico asociado con algunas patologías cardiacas. Asimismo, en neuronas, la regulación al alza de Kv4.2 inducida por factores neurotróficos como la neuregulina-1 o neuritina, parece estar mediada por la activación de la vía de Akt [539, 540].

Los sustratos de la Akt incluyen la GSK3 β (de sus siglas en inglés glycogen synthase kinase) y los factores de transcripción Foxo 1 y Foxo 3a [541]. Se sabe que la familia de factores de transcripción Foxo regula la actividad del promotor de varios canales de potasio [542]. La GSK3 β también modula la actividad de varios factores de transcripción entre los que se incluyen los promotores de los factores de transcripción nucleares de las células T activas (NFAT), promoviendo su salida del núcleo [543], lo que puede contribuir a la regulación transcripcional de la expresión de los canales de potasio [544].

En roedores, la I_{toF} tiene una gran importancia en la fase 1 de la repolarización del ventrículo y en la duración del potencial de acción. En humanos, sin embargo, la contribución directa de la I_{toF} a la duración del potencial de acción ventricular es limitada, aunque cambios en la amplitud de la I_{toF}

pueden alterar la amplitud de la fase de meseta y así de forma indirecta cambiar la cinética de otras corrientes iónicas transmembrana como la I_{CaL} [545]. De esta forma, cambios en la expresión de los canales que codifican para la I_{toF} pueden modular el acoplamiento excitación-contracción en células del miocardio [497]. Se puede, por tanto, especular que la regulación al alza de los canales de la I_{toF} inducida por leptina podría reducir la duración del potencial de acción mediante la disminución de la duración de la entrada de calcio y también atenuar la contractilidad cardiaca. Por otro lado, las consecuencias del efecto de leptina en los canales de I_{toF} en cardiomiocitos aislados de corazones con una patología pueden ser diferente.

Como se ha explicado previamente, los niveles de leptina se encuentran elevados en la obesidad humana y, además, se sabe que la obesidad se asocia frecuentemente con patologías como la diabetes y/o la hipertensión, dando lugar a un estado de complicación de la obesidad [546]. Este estatus se caracteriza por efectos deletéreos en el corazón que incluyen hipertrofia cardiaca patológica y disminución de corrientes de potasio [65, 547, 548]. En este escenario, los mecanismos a través de los cuales leptina induce una regulación al alza de los canales de I_{toF} como los observados en nuestro estudio, podrían tener un efecto beneficioso al compensar las reservas repolarizantes de potasio reducidas que se producen en la hipertrofia patológica asociada a diabetes o hipertensión. De esta forma, leptina podría proteger el corazón patológico de una prolongación excesiva de la duración del potencial de acción, reduciendo así el riesgo de aparición de arritmias y muerte súbita en pacientes con obesidad complicada. La posibilidad de que leptina, a través de este mecanismo, pueda participar en los resultados clínicos más favorables que se ven en pacientes obesos con insuficiencia cardiaca congestiva [549] o enfermedad coronaria [266] en comparación con pacientes normopeso, fenómeno conocido como paradoja de la obesidad, es una cuestión importante a analizar.

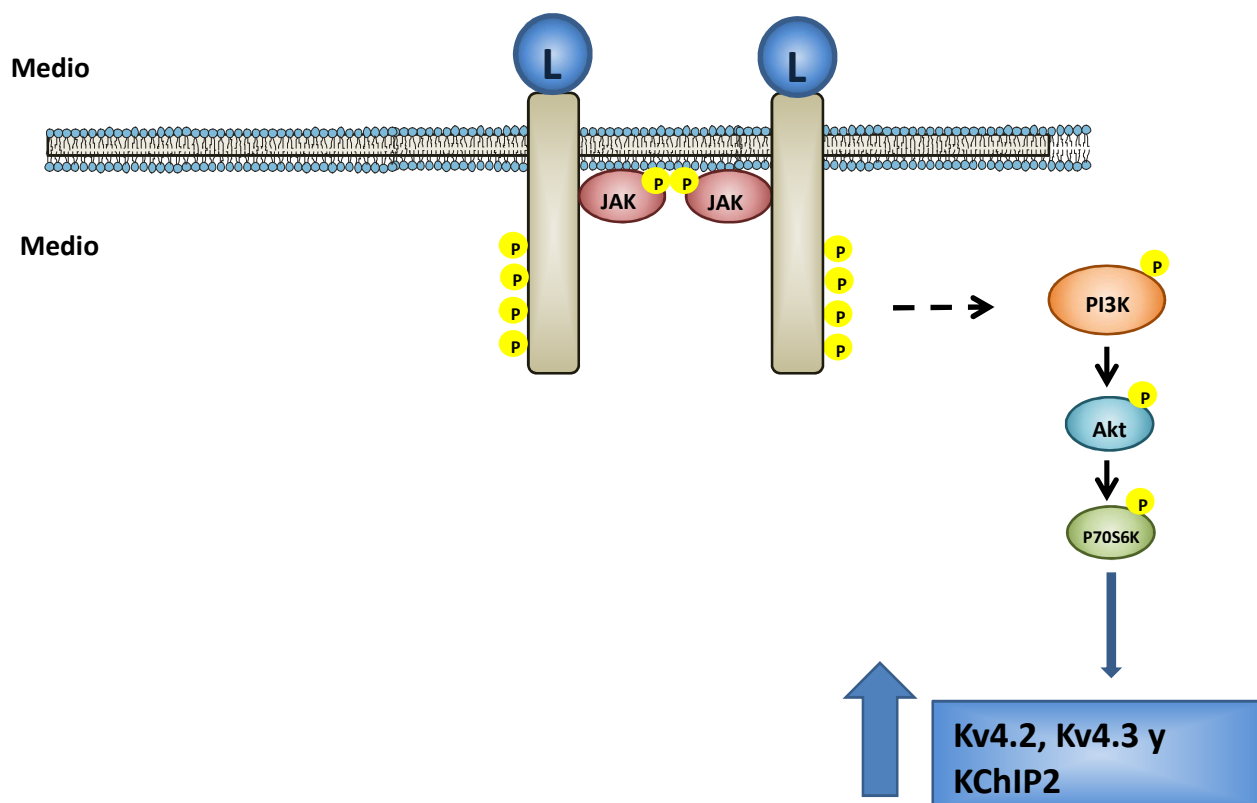


Figura 77. Esquema de los posibles mecanismos implicados en el efecto de leptina sobre el remodelado iónico. Leptina a través de la activación de la vía e Akt induce un incremento de la expresión de las subunidades Kv4.2, Kv4.3 y KCHIP2 del canal de potasio que codifica la I_{tof} .

3. EFECTO DE LA LEPTINA SOBRE EL ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN EN UN MODELO *IN VIVO*

Varios estudios han demostrado que leptina produce un efecto inotrópico negativo dependiente de la concentración en miocitos adultos aislados [152] y que este efecto no tiene lugar en ratas espontáneamente hipertensas. Se ha postulado que esta discrepancia en los efectos de leptina en la contracción cardíaca se debe a que en los miocitos de ratas espontáneamente hipertensas no tiene lugar la activación de la vía de STAT3 inducida por leptina [550]. Por lo tanto, los miocitos procedentes de las ratas espontáneamente hipertensas presentarían una resistencia a los efectos de la leptina a pesar de expresar las mismas cantidades de receptor OB-Rb [550]. Sin embargo, hasta el momento en el que se inició el presente estudio se desconocían los efectos de un tratamiento a largo plazo con leptina en la función y la contractilidad cardíaca.

El acoplamiento excitación-contracción es el proceso que, desde la excitación del miocito, da lugar a la contracción del músculo cardíaco. En este proceso, son fundamentales las concentraciones intracelulares de calcio y la regulación de distintas proteínas implicadas en la homeostasis del mismo como la SERCA, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el receptor de la rianodina.

En general, se acepta que fallos en la homeostasis del calcio dan lugar a RyR con una cinética alterada que a su vez dan lugar a una disminución del contenido de calcio del retículo que tendrá como consecuencia una disminución de la contractilidad, frecuentemente asociada con la insuficiencia cardíaca [470, 471, 473-475]. Además, también se han propuesto como posibles causas de la disminución de la carga del retículo que ocurre durante la insuficiencia cardíaca una disminución de la función de la SERCA y un incremento del NCX [478].

Por otro lado, leptina *in vivo* ejerce efectos en el corazón no solo de manera directa, sino que también ejerce efectos indirectos derivados de un incremento de la presión arterial [508]. Para poder aislar los efectos cardíacos directos de leptina de los efectos derivados del incremento de la presión arterial, se utilizó un modelo de infusión crónica de leptina durante 3 semanas con una dosis que no produce efectos hipertensivos [96]. Esta dosis no modificó ni la expresión de receptores de leptina ni el peso corporal de los animales o el peso del corazón normalizado por la tibia. Sin embargo, sí tuvo efectos en la función cardíaca, que se vio disminuida tras el tratamiento con leptina observándose una disminución de la fracción de eyección y de la fracción de acortamiento en el ecocardiograma. Esta disfunción cardíaca se acompañó de una disminución de los transitorios observada en los animales tratados con leptina, que sin embargo, no presentaron alteraciones de la carga del retículo sarcoplásmico.

Una de las proteínas implicadas en la regulación del proceso de acoplamiento excitación-contracción cardíaco es el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Se ha relacionado un aumento de la expresión del NCX con la hipertrofia e insuficiencia cardíaca [420, 551]. De esta forma, alteraciones en su actividad pueden contribuir a la patogénesis de disfunciones contráctiles, así como modificar la duración del potencial de acción cardíaco e inducir arritmias [552]. El flujo de Ca^{2+} a través del NCX es lento en comparación con el de la SERCA [553]. Sin embargo, es el mecanismo más importante implicado en la extrusión de Ca^{2+} al exterior celular. Por este motivo, una mayor o menor función del NCX puede tener como consecuencia una disminución del $[\text{Ca}^{2+}]_i$,

del contenido de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico o de la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} (al acelerar la constante de salida del Ca^{2+} al exterior), así como alteraciones de la duración del potencial de acción cardíaco [552].

Nuestros resultados muestran una extrusión más rápida del calcio citosólico en los animales tratados con leptina durante 3 semanas. Este vaciado más rápido del Ca^{2+} citosólico se corresponde con un incremento de la expresión proteica del NCX observado en estos animales. La sobreexpresión del NCX, en principio, tendría como consecuencia una mejora en la relajación de la célula [419]. Sin embargo, también contribuye a una disminución de la función contráctil, incluso con una mejor función diastólica. El resultado de esta menor función contráctil es una disfunción sistólica, dato que se corresponde con los resultados observados por ecocardiografía en estos animales.

Por otro lado, también se sabe que un aumento de la expresión del NCX puede ser un factor beneficioso frente a la isquemia cardíaca [554], por lo que este mecanismo podría estar implicado en los efectos cardioprotectores de leptina frente al daño por isquemia y reperfusión [82].

Asimismo, se ha establecido que en estadios previos a la insuficiencia cardíaca y durante la hipertrofia compensada, el incremento de la expresión proteica de NCX se acompaña de un incremento en la expresión o la actividad de la SERCA y el fosfolambano, con un cociente SERCA/fosfolambano similar al control. Sin embargo, cuando la función cardíaca y la función de los miocitos se deteriora, el NCX sí se encuentra incrementado pero no ocurre lo mismo con la SERCA y el fosfolambano que pueden encontrarse disminuidos [555, 556].

En nuestro estudio se ha observado un incremento de los niveles de expresión de NCX que no se acompañó de un incremento en la actividad del fosfolambano, el principal regulador de la actividad SERCA. Estas observaciones se corresponden con la situación de disfunción previamente descrita, en la que los niveles de NCX se encuentran elevados, pero no así la SERCA. Una disminución de la expresión o la actividad de la SERCA resultarían en una menor carga del retículo sarcoplásmico que, asimismo, contribuiría a una disfunción sistólica. Sin embargo, en el estadio de la patología inducida por leptina tras 3 semanas de tratamiento, la carga del retículo permanece inalterada, lo que es consistente con el mantenimiento de la actividad de la SERCA en los miocitos.

La regulación de la apertura del canal de la rianodina ha suscitado gran controversia en los últimos años [469, 513]. En particular, la contribución de la fosforilación del RyR en la Ser 2808 por la PKA ha sido objeto de debate y de numerosas revisiones. Se sabe que el RyR se fosforila en la Ser 2814 ó 2815 según la especie por la CaMKII y en la Ser 2808 ó 2809 por la PKA. Además, en los últimos años se ha descrito otra fosforilación en la Ser 2030 ó 2031 modulada por PKA que también puede contribuir a la regulación del canal [514]. Ya en 1995 Valdivia y colaboradores describieron que la PKA puede modular la actividad de los RyR de forma que a corto plazo se produce un aumento en la probabilidad de apertura del mismo, pero que a largo plazo da lugar a un mecanismo de retroalimentación negativa por el que la probabilidad de apertura del canal nuevamente se reduce. Este mecanismo de adaptación tiene como consecuencia alteraciones en la cinética del canal [557]. Posteriormente, el grupo de Andrew Marks, demostró en el año 2000 que la fosforilación de la Ser2808 del RyR por la PKA da lugar a una disociación de la proteína reguladora del canal FKBP12.6. Esto tiene como consecuencia una alteración de la función del canal, observándose una desestabilización de la estructura tetramérica del mismo que da lugar a estados de subconductancias [479] llegándose a observar subconductancias en un 52% de los RyR de corazones insuficientes. Sin embargo, otros grupos, como el grupo de Donald Bers han restado importancia a la contribución de la regulación del RyR por PKA [513], de forma que en sus trabajos han observado que la regulación del canal por CaMKII y su fosforilación en la Ser2815 contribuiría de una forma mucho más importante al mantenimiento de la homeostasis del calcio.

En la presente tesis doctoral hemos observado que el tratamiento con leptina a largo plazo induce un incremento de la fosforilación del RyR en la Ser 2808 pero no en la Ser 2815. Por otro lado, se sabe que leptina puede activar PKA [558] y que una sobreactivación de la PKA regula la cinética del canal de rianodina. Además, hemos demostrado que tanto los transitorios de calcio como los sparks se encuentran disminuidos en amplitud por el tratamiento con leptina. En este sentido, la hiperfosforilación de la Ser2808 por PKA puede dar lugar a la desestabilización del canal y por tanto a estados de subconductancias [479] que serían los responsables de la disminución de la salida de Ca^{2+} del retículo. Además, la frecuencia de sparks se encuentra inalterada a pesar de la hiperfosforilación del canal por PKA. Este fenómeno puede explicarse como consecuencia del mecanismo de adaptación del canal propuesto por Valdivia y colaboradores [557] por el cual, tras la

regulación por PKA el canal aumenta su probabilidad de apertura durante un breve espacio de tiempo para luego volver a estados basales.

Asimismo, hemos observado un incremento de la potenciación post-reposo en los animales tratados con leptina. Este incremento del calcio liberado del retículo en el primer estímulo tras el estado de reposo puede deberse a que puesto que hay una menor liberación de calcio en forma de sparks durante la fase en la que la célula no se estimula, la carga del retículo es ligeramente mayor en este punto.

Está ampliamente descrito que la corriente de calcio tipo L es la corriente con más importancia en el inicio del proceso de acoplamiento excitación-contracción y es suficiente para activar varios canales de rianodina mediante cambios en la concentración de calcio local [459]. Sin embargo, en nuestro modelo, la corriente de calcio tipo L permanece inalterada, por lo que se han explorado otros mecanismos capaces de inducir modificaciones en la homeostasis del calcio sin implicar a la I_{CaL} .

En estudios previos en miocitos tratados con leptina *in vitro*, se ha observado que la disminución de la contractilidad celular inducida por leptina implica la producción de NO [152]. Se sabe que el NO se genera por una familia de enzimas conocidas como óxido nítrico sintetasas (NOS) que catalizan la conversión del aminoácido catiónico L-arginina en L-citrulina en presencia de oxígeno (O_2) y NADPH. Se han descrito 3 isoformas de NOS que comparten entre el 50% y el 60% de homología. De ellas la NOS1 ó nNOS y la NOS3 o eNOS se expresan de forma constitutiva en el tejido miocárdico y son sensibles a la regulación por Ca^{2+} . Por el contrario la NOS2 o iNOS es una isoforma inducible y no se regula por las concentraciones de Ca^{2+} intracelular [521]. De todas ellas, la que se expresa mayoritariamente en los miocitos es la NOS3 [522]. Un incremento en los niveles de NO intracelulares induce una disminución de la contractilidad miocárdica [515-518], aunque también se ha visto que el NO de forma aguda puede inducir un efecto inotrópico positivo [519]. Esta discrepancia puede deberse a un efecto bifásico del NO, de tal forma que bajas concentraciones del NO dan lugar a un efecto inotrópico positivo y concentraciones más altas a un efecto inotrópico negativo [520]. Sin embargo, los mecanismos implicados en este efecto, entre los que se han incluido alteraciones en la sensibilidad de las miofibrillas al Ca^{2+} y modificaciones en el equilibrio red-ox celular, aún son objeto de estudio.

Nuestros estudios demuestran que el tratamiento a largo plazo con leptina induce un incremento de la actividad de la NOS3 o eNOS, sugiriendo un incremento de los niveles de NO en el miocardio que pueden ser en parte responsables de la disminución de la contractilidad que se observa en los animales tratados con leptina.

Recientemente se ha descrito que el tratamiento con leptina induce un incremento de la expresión de SIRT-1 en la corteza cerebral [524]. Por otro lado, se sabe que la SIRT-1 puede regular la actividad de la eNOS en la arteria aorta mediante un mecanismo de desacetilación en residuos de lisinas [559] y que estas lisinas se encuentran en el dominio de unión a la calmodulina [523]. Nuestros resultados muestran que leptina también induce un incremento de los niveles de expresión proteica de SIRT-1 a nivel miocárdico. Además, mediante inmunoprecipitación hemos demostrado que en los animales tratados con leptina el porcentaje de eNOS acetilada es significativamente menor que en los animales controles. Esta menor acetilación corresponde con una mayor actividad de la eNOS y sugiere una implicación de SIRT-1 (u otras desacetilasas) en este efecto.

Cada vez existen más evidencias de que el estrés oxidativo y nitrosativo juega un papel fundamental en la patología miocárdica. En concreto se ha implicado un aumento del estrés oxidativo o nitrosativo en el desarrollo de hipertrofia [560], la insuficiencia cardiaca [561] la isquemia miocárdica [562] y la fibrilación auricular [563].

En la célula, las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas inestables y muy reactivas que pueden ser producidas por xantina oxidasas, lipoxigenasas, ciclooxigenasas, por las mitocondrias e incluso por la eNOS. La concentración de especies reactivas de nitrógeno (RNS) celular se relaciona directamente con la producción de NO. El NO reacciona rápido con el anión superóxido (O_2^-) dando lugar a peroxinitrito ($ONOO^-$) que dará lugar a modificaciones proteicas. En condiciones basales, tanto las ROS como las RNS ejercen funciones fisiológicas en la defensa del organismo frente a patógenos e incluso en la regulación de la expresión génica y el crecimiento celular. Sin embargo un exceso de estas especies puede ser muy negativo para el funcionamiento celular al dañar el ADN y proteínas de forma inespecífica, y porque modifican las cascadas reguladas por el equilibrio red-ox celular. Se sabe que las ROS pueden modular de forma directa proteínas relacionadas con el proceso de acoplamiento excitación contracción cardiaco [564] y que un incremento de peroxinitrito (debido a la interacción del anión superóxido con el NO) puede dar

lugar a procesos citotóxicos entre los que también se incluye la alteración de la homeostasis del calcio [565, 566]. Por otro lado, los efectos del NO y las RNS en la función cardiaca se deben a la actividad de las distintas isoformas de la óxido nítrico sintetasa y su localización celular. En concreto la eNOS se localiza en las caveolas y puede producir una disminución de la contractilidad mediante la modulación de la estimulación β -adrenérgica y de la actividad de la PKA, que puede a su vez modular la fosforilación del canal de la rianodina en su sitio específico [567-569]. Por tanto, un incremento del estrés oxidativo y nitrosativo se relacionaría directamente con la patogénesis de la disfunción contráctil, existiendo una fuerte relación entre el balance red-ox/nitroso y la función de los cardiomiocitos así como de sus propiedades eléctricas.

Así pues, nuestros resultados demuestran que un aumento de los niveles de leptina en animales sanos, ejerce efectos deletéreos a nivel cardiaco. Nosotros proponemos, sin embargo, que en situaciones en las que la relajación se encuentra comprometida, algunos de los efectos inducidos por leptina como el aumento de la expresión del NCX, pueden contribuir a una mejora de la situación patológica [419]. Por otro lado, la hiperfosforilación de la RyR en el sitio de la PKA puede conducir a una situación de subconductancia del canal de forma que la liberación de calcio del retículo puede estar disminuida. En una situación fisiológica, esta menor salida de calcio del retículo sería negativa para la correcta contractilidad de la célula. Sin embargo, en algunas situaciones patológicas como la insuficiencia cardiaca, el retículo sarcoplásmico presenta una mayor liberación de calcio de forma espontánea por parte del retículo, conduciendo a una menor carga del retículo sarcoplásmico y como consecuencia a una disminución de la contractilidad [473]. En estas circunstancias, la disminución de la liberación espontánea de calcio inducida por leptina debida a los estados de subconductancias de los canales pueden contribuir al mantenimiento de la carga del retículo sarcoplásmico y de esta forma a mantener la contracción cardiaca. Por lo tanto, nuestros datos en conjunto apoyan la hipótesis de que los efectos de leptina podrían ser un mecanismo protector en una situación patológica.

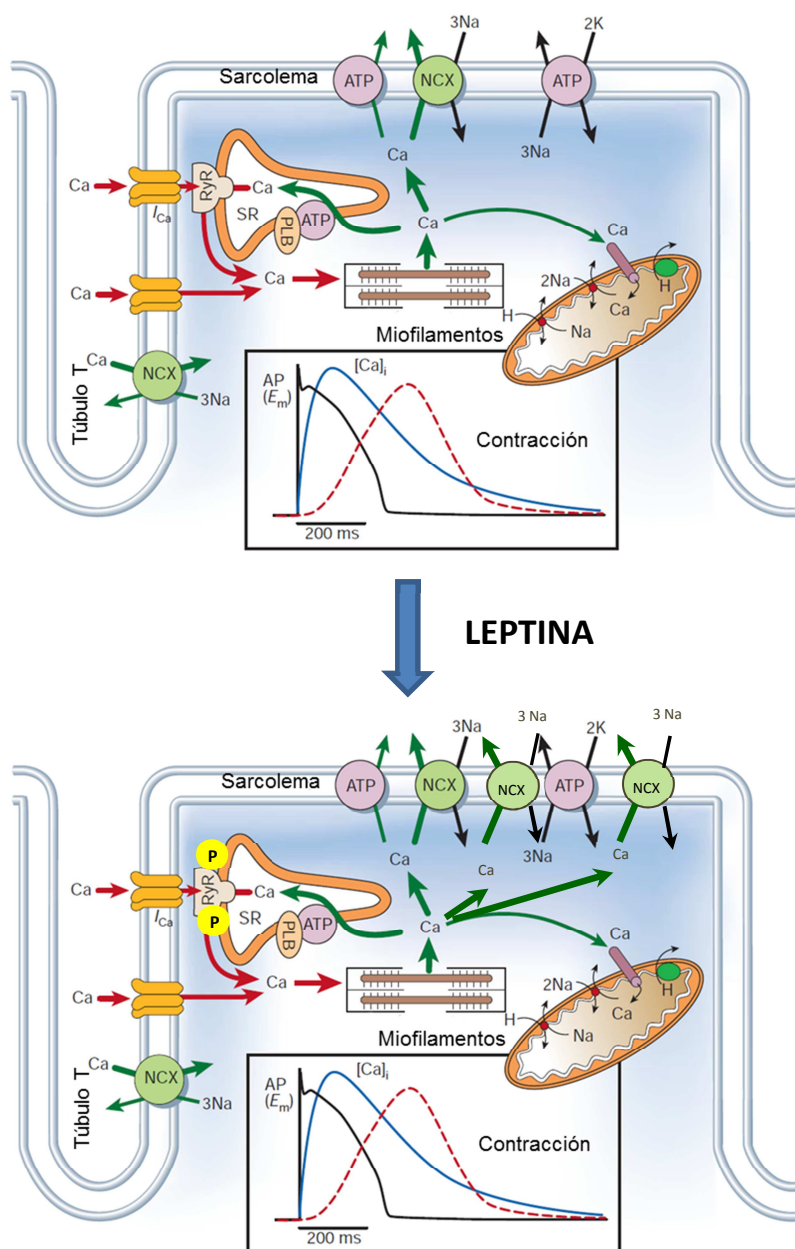


Figura 78. Esquema de los posibles mecanismos implicados en el efecto de leptina sobre el acoplamiento excitación-contracción cardíaco (Modificada de Bers DM, Nature 2002). Leptina induce un incremento de la expresión de NCX y de la fosforilación del RyR en la Ser2808.

CONCLUSIONES

1. Leptina induce un efecto pro-hipertrófico en cardiomiocitos ventriculares adultos que está mediado al menos en parte por la activación de la vía de Akt/mTOR y en el que también participa la activación de la vía de ERK1/2.
2. Leptina induce un remodelado iónico en los cardiomiocitos ventriculares adultos aumentando la I_{tof} . Este remodelado iónico se debe al aumento de la expresión proteica de las subunidades α Kv4.2 y Kv4.3 del canal de potasio y de la subunidad auxiliar KChIP2, que está mediado al menos en parte por la activación de la vía de Akt.
3. Una dosis moderada y no hipertensiva de leptina conduce a una insuficiencia cardiaca in vivo que se acompaña de un aumento de la expresión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y alteraciones de los canales de rianodina en el sitio de fosforilación de PKA.
4. Leptina, en dosis moderadas, induce una activación de la vía de eNOS mediada por desacetilasas. Este mecanismo puede participar en el efecto inotrópico negativo de leptina.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] KENNEDY GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1953;140:578-96.
- [2] HERVEY GR. The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol.* 1959;145:336-52.
- [3] Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia.* 1973;9:294-8.
- [4] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372:425-32.
- [5] Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, et al. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature.* 1997;387:206-9.
- [6] Tsuruo Y, Sato I, Iida M, Murakami T, Ishimura K, Shima K. Immunohistochemical detection of the ob gene product (leptin) in rat white and brown adipocytes. *Horm Metab Res.* 1996;28:753-5.
- [7] Purdham DM, Zou MX, Rajapurohitam V, Karmazyn M. Rat heart is a site of leptin production and action. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H2877-84.
- [8] Perego L, Pizzocri P, Corradi D, Maisano F, Paganelli M, Fiorina P, et al. Circulating leptin correlates with left ventricular mass in morbid (grade III) obesity before and after weight loss induced by bariatric surgery: a potential role for leptin in mediating human left ventricular hypertrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:4087-93.
- [9] Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, et al. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest.* 1996;98:1277-82.
- [10] Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Magosin S, et al. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest.* 1996;97:1344-7.
- [11] Åhrén B, Larsson H, Wilhelmsson C, Näsman B, Olsson T. Regulation of circulating leptin in humans. *Endocrine.* 1997;7:1-8.
- [12] Åhrén B, Månsson S, Gingerich RL, Havel PJ. Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting. *Am J Physiol.* 1997;273:R113-20.
- [13] Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 1995;83:1263-71.
- [14] Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A, Kratzsch J. Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283:982-8.
- [15] Löllmann B, Grüninger S, Stricker-Krongrad A, Chiesi M. Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;238:648-52.
- [16] Chan JL, Blüher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. *Diabetes.* 2002;51:2105-12.
- [17] Bjørbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem.* 1997;272:32686-95.
- [18] Chua SC, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, et al. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science.* 1996;271:994-6.
- [19] Ren J, Ma H. Impaired cardiac function in leptin-deficient mice. *Curr Hypertens Rep.* 2008;10:448-53.
- [20] Dixon RA, Davidson SM, Wynne AM, Yellon DM, Smith CC. The cardioprotective actions of leptin are lost in the Zucker obese (fa/fa) rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009;53:311-7.
- [21] Murakami M, Narazaki M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamaguchi M, et al. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:11349-53.
- [22] Uotani S, Bjørbaek C, Tornøe J, Flier JS. Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes.* 1999;48:279-86.
- [23] Bjørbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:305-31.
- [24] Bjørbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, et al. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology.* 1998;139:3485-91.

- [25] Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:11073-8.
- [26] Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV, Moar K, Trayhurn P, Williams LM. Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;232:383-7.
- [27] Lin J, Barb CR, Matteri RL, Kraeling RR, Chen X, Meinersmann RJ, et al. Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig. *Domest Anim Endocrinol*. 2000;19:53-61.
- [28] Sweeney G. Leptin signalling. *Cell Signal*. 2002;14:655-63.
- [29] Havel PJ, Kasim-Karakas S, Mueller W, Johnson PR, Gingerich RL, Stern JS. Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:4406-13.
- [30] Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, Landt M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes*. 1996;45:984-7.
- [31] Girard J. Is leptin the link between obesity and insulin resistance? *Diabetes Metab*. 1997;23 Suppl 3:16-24.
- [32] Kolaczynski JW, Goldstein BJ, Considine RV. Dexamethasone, OB gene, and leptin in humans; effect of exogenous hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:3895-7.
- [33] Yoshida T, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T. Regulation of expression of leptin mRNA and secretion of leptin by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;232:822-6.
- [34] Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology*. 1997;138:4463-72.
- [35] Ogawa Y, Masuzaki H, Hosoda K, Aizawa-Abe M, Suga J, Suda M, et al. Increased glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic skinny mice overexpressing leptin. *Diabetes*. 1999;48:1822-9.
- [36] Barthel A, Kohn AD, Luo Y, Roth RA. A constitutively active version of the Ser/Thr kinase Akt induces production of the ob gene product, leptin, in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*. 1997;138:3559-62.
- [37] Giacobino JP. Role of the beta3-adrenoceptor in the control of leptin expression. *Horm Metab Res*. 1996;28:633-7.
- [38] Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404:661-71.
- [39] Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev*. 2005;85:1131-58.
- [40] Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395:763-70.
- [41] Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2002;415:339-43.
- [42] Hu Z, Cha SH, Chohnan S, Lane MD. Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12624-9.
- [43] Wolfgang MJ, Cha SH, Sidhaye A, Chohnan S, Cline G, Shulman GI, et al. Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:19285-90.
- [44] Zhou YT, Shimabukuro M, Koyama K, Lee Y, Wang MY, Trieu F, et al. Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:6386-90.
- [45] Cernkovich ER, Deng J, Bond MC, Combs TP, Harp JB. Adipose-specific disruption of signal transducer and activator of transcription 3 increases body weight and adiposity. *Endocrinology*. 2008;149:1581-90.
- [46] Frühbeck G, Aguado M, Gómez-Ambrosi J, Martínez JA. Lipolytic effect of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and ob/ob mice, but not db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;250:99-102.
- [47] Dube JJ, Bhatt BA, Dedousis N, Bonen A, O'Doherty RM. Leptin, skeletal muscle lipids, and lipid-induced insulin resistance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293:R642-50.
- [48] Palanivel R, Eguchi M, Shuralyova I, Coe I, Sweeney G. Distinct effects of short- and long-term leptin treatment on glucose and fatty acid uptake and metabolism in HL-1 cardiomyocytes. *Metabolism*. 2006;55:1067-75.

- [49] Atkinson LL, Fischer MA, Lopaschuk GD. Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase-malonyl-CoA axis. *J Biol Chem.* 2002;277:29424-30.
- [50] Bryson JM, Phuyal JL, Swan V, Caterson ID. Leptin has acute effects on glucose and lipid metabolism in both lean and gold thioglucose-obese mice. *Am J Physiol.* 1999;277:E417-22.
- [51] Haynes WG. Role of leptin in obesity-related hypertension. *Exp Physiol.* 2005;90:683-8.
- [52] Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Mark AL, Haynes WG. Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes.* 2005;54:2012-8.
- [53] Beltowski J. Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2006;189:47-60.
- [54] Mertens A, Verhamme P, Bielicki JK, Phillips MC, Quarck R, Verreth W, et al. Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with increased macrophage homing and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice: LCAT gene transfer decreases atherosclerosis. *Circulation.* 2003;107:1640-6.
- [55] Korda M, Kubant R, Patton S, Malinski T. Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H1514-21.
- [56] Bodary PF. Links between adipose tissue and thrombosis in the mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2284-91.
- [57] Nakata M, Yada T, Soejima N, Maruyama I. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes.* 1999;48:426-9.
- [58] Dellas C, Schäfer K, Rohm I, Lankeit M, Ellrott T, Faustin V, et al. Absence of leptin resistance in platelets from morbidly obese individuals may contribute to the increased thrombosis risk in obesity. *Thromb Haemost.* 2008;100:1123-9.
- [59] Konstantinides S, Schäfer K, Koschnick S, Loskutoff DJ. Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J Clin Invest.* 2001;108:1533-40.
- [60] Bodary PF, Westrick RJ, Wickenheiser KJ, Shen Y, Eitzman DT. Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice. *JAMA.* 2002;287:1706-9.
- [61] Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature.* 1997;389:374-7.
- [62] Haque MS, Minokoshi Y, Hamai M, Iwai M, Horiuchi M, Shimazu T. Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes.* 1999;48:1706-12.
- [63] Haap M, Houdali B, Maerker E, Renn W, Machicao F, Hoffmeister HM, et al. Insulin-like effect of low-dose leptin on glucose transport in Langendorff rat hearts. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2003;111:139-45.
- [64] Unger RH, Zhou YT, Orci L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:2327-32.
- [65] Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, et al. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med.* 2002;347:305-13.
- [66] Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard ML, Bartels ED, Goetze JP, Andersen CB, et al. Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology.* 2003;144:3483-90.
- [67] Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14:281-7.
- [68] Lee Y, Wang MY, Kakuma T, Wang ZW, Babcock E, McCorkle K, et al. Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J Biol Chem.* 2001;276:5629-35.
- [69] Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang MY, Trieu F, Lee Y, et al. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:4637-41.
- [70] Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, et al. Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med.* 2002;346:570-8.
- [71] Unger RH. Hyperleptinemia: protecting the heart from lipid overload. *Hypertension.* 2005;45:1031-4.
- [72] Young ME, Guthrie PH, Razeghi P, Leighton B, Abbasi S, Patil S, et al. Impaired long-chain fatty acid oxidation and contractile dysfunction in the obese Zucker rat heart. *Diabetes.* 2002;51:2587-95.
- [73] Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis.* 2009;14:536-48.
- [74] Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med.* 1996;335:1182-9.

- [75] Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*. 1997;336:1131-41.
- [76] Todor A, Sharov VG, Tanhehco EJ, Silverman N, Bernabei A, Sabbah HN. Hypoxia-induced cleavage of caspase-3 and DFF45/ICAD in human failed cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H990-5.
- [77] Shin EJ, Schram K, Zheng XL, Sweeney G. Leptin attenuates hypoxia/reoxygenation-induced activation of the intrinsic pathway of apoptosis in rat H9c2 cells. *J Cell Physiol*. 2009;221:490-7.
- [78] Eguchi M, Liu Y, Shin EJ, Sweeney G. Leptin protects H9c2 rat cardiomyocytes from H₂O₂-induced apoptosis. *FEBS J*. 2008;275:3136-44.
- [79] McGaffin KR, Moravec CS, McTiernan CF. Leptin signaling in the failing and mechanically unloaded human heart. *Circ Heart Fail*. 2009;2:676-83.
- [80] Barouch LA, Gao D, Chen L, Miller KL, Xu W, Phan AC, et al. Cardiac myocyte apoptosis is associated with increased DNA damage and decreased survival in murine models of obesity. *Circ Res*. 2006;98:119-24.
- [81] Trivedi P, Yang R, Barouch LA. Decreased p110 α catalytic activity accompanies increased myocyte apoptosis and cardiac hypertrophy in leptin deficient ob/ob mice. *Cell Cycle*. 2008;7:560-5.
- [82] Smith CC, Mocanu MM, Davidson SM, Wynne AM, Simpkin JC, Yellon DM. Leptin, the obesity-associated hormone, exhibits direct cardioprotective effects. *Br J Pharmacol*. 2006;149:5-13.
- [83] Oka T, Komuro I. Molecular mechanisms underlying the transition of cardiac hypertrophy to heart failure. *Circ J*. 2008;72 Suppl A:A13-6.
- [84] Wright JW, Mizutani S, Harding JW. Pathways involved in the transition from hypertension to hypertrophy to heart failure. Treatment strategies. *Heart Fail Rev*. 2008;13:367-75.
- [85] Weeks KL, McMullen JR. The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes? *Physiology (Bethesda)*. 2011;26:97-105.
- [86] Maron BJ. Distinguishing hypertrophic cardiomyopathy from athlete's heart physiological remodelling: clinical significance, diagnostic strategies and implications for preparticipation screening. *Br J Sports Med*. 2009;43:649-56.
- [87] Madani S, De Girolamo S, Muñoz DM, Li RK, Sweeney G. Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. 2006;69:716-25.
- [88] Rajapurohitam V, Gan XT, Kirshenbaum LA, Karmazyn M. The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 2003;93:277-9.
- [89] Rajapurohitam V, Javadov S, Purdham DM, Kirshenbaum LA, Karmazyn M. An autocrine role for leptin in mediating the cardiomyocyte hypertrophic effects of angiotensin II and endothelin-1. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41:265-74.
- [90] Xu FP, Chen MS, Wang YZ, Yi Q, Lin SB, Chen AF, et al. Leptin induces hypertrophy via endothelin-1-reactive oxygen species pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation*. 2004;110:1269-75.
- [91] Rajapurohitam V, Izaddoustdar F, Martinez-Abundis E, Karmazyn M. Leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy reveals both calcium-dependent and calcium-independent/RhoA-dependent calcineurin activation and NFAT nuclear translocation. *Cell Signal*. 2012;24:2283-90.
- [92] Zeidan A, Javadov S, Karmazyn M. Essential role of Rho/ROCK-dependent processes and actin dynamics in mediating leptin-induced hypertrophy in rat neonatal ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. 2006;72:101-11.
- [93] Zeidan A, Hunter JC, Javadov S, Karmazyn M. mTOR mediates RhoA-dependent leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem*. 2011;352:99-108.
- [94] Zeidan A, Javadov S, Chakrabarti S, Karmazyn M. Leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy involves selective caveolae and RhoA/ROCK-dependent p38 MAPK translocation to nuclei. *Cardiovasc Res*. 2008;77:64-72.
- [95] Tajmir P, Ceddia RB, Li RK, Coe IR, Sweeney G. Leptin increases cardiomyocyte hyperplasia via extracellular signal-regulated kinase- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling pathways. *Endocrinology*. 2004;145:1550-5.
- [96] Abe Y, Ono K, Kawamura T, Wada H, Kita T, Shimatsu A, et al. Leptin induces elongation of cardiac myocytes and causes eccentric left ventricular dilatation with compensation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H2387-96.

- [97] Hou N, Luo MS, Liu SM, Zhang HN, Xiao Q, Sun P, et al. Leptin induces hypertrophy through activating the peroxisome proliferator-activated receptor α pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37:1087-95.
- [98] Park SY, Cho YR, Finck BN, Kim HJ, Higashimori T, Hong EG, et al. Cardiac-specific overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor- α causes insulin resistance in heart and liver. *Diabetes*. 2005;54:2514-24.
- [99] Barouch LA, Berkowitz DE, Harrison RW, O'Donnell CP, Hare JM. Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. *Circulation*. 2003;108:754-9.
- [100] Mascareno E, Beckles D, Dhar-Mascareno M, Siddiqui MA. Enhanced hypertrophy in ob/ob mice due to an impairment in expression of atrial natriuretic peptide. *Vascul Pharmacol*. 2009;51:198-204.
- [101] Schram K, Sweeney G. Implications of myocardial matrix remodeling by adipokines in obesity-related heart failure. *Trends Cardiovasc Med*. 2008;18:199-205.
- [102] Schram K, Wong MM, Palanivel R, No EK, Dixon IM, Sweeney G. Increased expression and cell surface localization of MT1-MMP plays a role in stimulation of MMP-2 activity by leptin in neonatal rat cardiac myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44:874-81.
- [103] Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:1784-9.
- [104] Zaman AK, Fujii S, Sawa H, Goto D, Ishimori N, Watano K, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates hypofibrinolysis and reduces cardiac perivascular fibrosis in genetically obese diabetic mice. *Circulation*. 2001;103:3123-8.
- [105] Toblli JE, Cao G, DeRosa G, Forcada P. Reduced cardiac expression of plasminogen activator inhibitor 1 and transforming growth factor beta1 in obese Zucker rats by perindopril. *Heart*. 2005;91:80-6.
- [106] Parish RC, Evans JD. Inflammation in chronic heart failure. *Ann Pharmacother*. 2008;42:1002-16.
- [107] Yndestad A, Damås JK, Oie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P. Systemic inflammation in heart failure—the whys and wherefores. *Heart Fail Rev*. 2006;11:83-92.
- [108] Yndestad A, Damås JK, Øie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P. Role of inflammation in the progression of heart failure. *Curr Cardiol Rep*. 2007;9:236-41.
- [109] Batra A, Pietsch J, Fedke I, Glaubien R, Okur B, Stroh T, et al. Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes. *Am J Pathol*. 2007;170:1931-41.
- [110] Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, et al. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:8374-8.
- [111] Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem*. 1997;272:6093-6.
- [112] White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, Baumann H, Tartaglia LA. Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. *J Biol Chem*. 1997;272:4065-71.
- [113] Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:6231-5.
- [114] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;374:1-20.
- [115] Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature*. 1995;377:591-4.
- [116] Ihle JN, Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet*. 1995;11:69-74.
- [117] Ghilardi N, Skoda RC. The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol*. 1997;11:393-9.
- [118] Jiang N, He TC, Miyajima A, Wojchowski DM. The box1 domain of the erythropoietin receptor specifies Janus kinase 2 activation and functions mitogenically within an interleukin 2 beta-receptor chimera. *J Biol Chem*. 1996;271:16472-6.
- [119] Bahrenberg G, Behrmann I, Barthel A, Hekerman P, Heinrich PC, Joost HG, et al. Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. *Mol Endocrinol*. 2002;16:859-72.
- [120] Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers MG. Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol Chem*. 2002;277:41547-55.

- [121] Kellerer M, Koch M, Metzinger E, Mushack J, Capp E, Häring HU. Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. *Diabetologia*. 1997;40:1358-62.
- [122] Murakami T, Yamashita T, Iida M, Kuwajima M, Shima K. A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231:26-9.
- [123] Yamashita T, Murakami T, Iida M, Kuwajima M, Shima K. Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction. *Diabetes*. 1997;46:1077-80.
- [124] Hileman SM, Tornøe J, Flier JS, Bjørbaek C. Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells. *Endocrinology*. 2000;141:1955-61.
- [125] McGaffin KR, Zou B, McTiernan CF, O'Donnell CP. Leptin attenuates cardiac apoptosis after chronic ischaemic injury. *Cardiovasc Res*. 2009;83:313-24.
- [126] Smith CC, Dixon RA, Wynne AM, Theodorou L, Ong SG, Subrayan S, et al. Leptin-induced cardioprotection involves JAK/STAT signaling that may be linked to the mitochondrial permeability transition pore. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H1265-70.
- [127] Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem*. 2000;275:14563-72.
- [128] Hegyi K, Fülöp K, Kovács K, Tóth S, Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int*. 2004;28:159-69.
- [129] Bjørbaek C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H, et al. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J Biol Chem*. 2001;276:4747-55.
- [130] Sharma V, Mustafa S, Patel N, Wambolt R, Allard MF, McNeill JH. Stimulation of cardiac fatty acid oxidation by leptin is mediated by a nitric oxide-p38 MAPK-dependent mechanism. *Eur J Pharmacol*. 2009;617:113-7.
- [131] Schram K, De Girolamo S, Madani S, Munoz D, Thong F, Sweeney G. Leptin regulates MMP-2, TIMP-1 and collagen synthesis via p38 MAPK in HL-1 murine cardiomyocytes. *Cell Mol Biol Lett*. 2010;15:551-63.
- [132] Shin HJ, Oh J, Kang SM, Lee JH, Shin MJ, Hwang KC, et al. Leptin induces hypertrophy via p38 mitogen-activated protein kinase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;329:18-24.
- [133] Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res*. 1999;253:239-54.
- [134] Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:965-1014.
- [135] Szanto I, Kahn CR. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:2355-60.
- [136] Lee CH, Inoki K, Guan KL. mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:443-67.
- [137] Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell*. 2000;103:253-62.
- [138] Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, et al. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279:L429-38.
- [139] Chen NG, Swick AG, Romsos DR. Leptin constrains acetylcholine-induced insulin secretion from pancreatic islets of ob/ob mice. *J Clin Invest*. 1997;100:1174-9.
- [140] Attoub S, Noe V, Pirola L, Bruyneel E, Chastre E, Mareel M, et al. Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways. *FASEB J*. 2000;14:2329-38.
- [141] Houslay MD. Compartmentalization of cyclic AMP phosphodiesterases, signalling 'crosstalk', desensitization and the phosphorylation of Gi-2 add cell specific personalization to the control of the levels of the second messenger cyclic AMP. *Adv Enzyme Regul*. 1995;35:303-38.
- [142] Houslay MD, Milligan G. Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci*. 1997;22:217-24.
- [143] Soderling SH, Beavo JA. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12:174-9.

- [144] Zhao AZ, Bornfeldt KE, Beavo JA. Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. *J Clin Invest*. 1998;102:869-73.
- [145] Ridley AJ. Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic*. 2001;2:303-10.
- [146] Evers EE, Zondag GC, Malliri A, Price LS, ten Klooster JP, van der Kammen RA, et al. Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *Eur J Cancer*. 2000;36:1269-74.
- [147] Murad F. Nitric oxide signaling: would you believe that a simple free radical could be a second messenger, autacoid, paracrine substance, neurotransmitter, and hormone? *Recent Prog Horm Res*. 1998;53:43-59; discussion -60.
- [148] Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:203-36.
- [149] Frühbeck G. Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes*. 1999;48:903-8.
- [150] Winters B, Mo Z, Brooks-Asplund E, Kim S, Shoukas A, Li D, et al. Reduction of obesity, as induced by leptin, reverses endothelial dysfunction in obese (Lep(ob)) mice. *J Appl Physiol*. 2000;89:2382-90.
- [151] Kimura K, Tsuda K, Baba A, Kawabe T, Boh-oka S, Iyata M, et al. Involvement of nitric oxide in endothelium-dependent arterial relaxation by leptin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273:745-9.
- [152] Nickola MW, Wold LE, Colligan PB, Wang GJ, Samson WK, Ren J. Leptin attenuates cardiac contraction in rat ventricular myocytes. Role of NO. *Hypertension*. 2000;36:501-5.
- [153] Dunbar JC, Hu Y, Lu H. Intracerebroventricular leptin increases lumbar and renal sympathetic nerve activity and blood pressure in normal rats. *Diabetes*. 1997;46:2040-3.
- [154] Jalali A, Morgan DA, Sivitz WI, Correia ML, Mark AL, Haynes WG. Does leptin cause functional peripheral sympatholysis? *Am J Hypertens*. 2001;14:615-8.
- [155] Shiuchi T, Nakagami H, Iwai M, Takeda Y, Cui T, Chen R, et al. Involvement of bradykinin and nitric oxide in leptin-mediated glucose uptake in skeletal muscle. *Endocrinology*. 2001;142:608-12.
- [156] Brunetti L, Orlando G, Michelotto B, Ragazzoni E, Vacca M. Leptin stimulates prostaglandin E2 and F2alpha, but not nitric oxide production in neonatal rat hypothalamus. *Eur J Pharmacol*. 1999;369:299-304.
- [157] Calapai G, Corica F, Corsonello A, Sautebin L, Di Rosa M, Campo GM, et al. Leptin increases serotonin turnover by inhibition of brain nitric oxide synthesis. *J Clin Invest*. 1999;104:975-82.
- [158] Morley JE, Alshaher MM, Farr SA, Flood JF, Kumar VB. Leptin and neuropeptide Y (NPY) modulate nitric oxide synthase: further evidence for a role of nitric oxide in feeding. *Peptides*. 1999;20:595-600.
- [159] Konturek PC, Brzozowski T, Sulekova Z, Brzozowska I, Duda A, Meixner H, et al. Role of leptin in ulcer healing. *Eur J Pharmacol*. 2001;414:87-97.
- [160] Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J*. 1999;13:1231-8.
- [161] Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzmán M, Brownlee M. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem*. 2001;276:25096-100.
- [162] Takekoshi K, Ishii K, Kawakami Y, Isobe K, Nanmoku T, Nakai T. Ca(2+) mobilization, tyrosine hydroxylase activity, and signaling mechanisms in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells: effects of leptin. *Endocrinology*. 2001;142:290-8.
- [163] Martin SS, Qasim A, Reilly MP. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:1201-10.
- [164] Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Cowley MA. Leptin resistance and obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14 Suppl 5:254S-8S.
- [165] Sweeney G. Cardiovascular effects of leptin. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7:22-9.
- [166] Hou N, Luo JD. Leptin and cardiovascular diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011;38:905-13.
- [167] Koh KK, Park SM, Quon MJ. Leptin and cardiovascular disease: response to therapeutic interventions. *Circulation*. 2008;117:3238-49.
- [168] Wannamethee SG, Shaper AG, Whincup PH, Lennon L, Sattar N. Obesity and risk of incident heart failure in older men with and without pre-existing coronary heart disease: does leptin have a role? *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:1870-7.
- [169] Karmazyn M, Purdham DM, Rajapurohitam V, Zeidan A. Leptin as a cardiac hypertrophic factor: a potential target for therapeutics. *Trends Cardiovasc Med*. 2007;17:206-11.

- [170] Karmazyn M, Purdham DM, Rajapurohitam V, Zeidan A. Signalling mechanisms underlying the metabolic and other effects of adipokines on the heart. *Cardiovasc Res*. 2008;79:279-86.
- [171] Ku IA, Farzaneh-Far R, Vittinghoff E, Zhang MH, Na B, Whooley MA. Association of low leptin with cardiovascular events and mortality in patients with stable coronary artery disease: the Heart and Soul Study. *Atherosclerosis*. 2011;217:503-8.
- [172] Rame JE, Barouch LA, Sack MN, Lynn EG, Abu-Asab M, Tsokos M, et al. Caloric restriction in leptin deficiency does not correct myocardial steatosis: failure to normalize PPAR α /PGC1 α and thermogenic glycerolipid/fatty acid cycling. *Physiol Genomics*. 2011;43:726-38.
- [173] Sloan C, Tuinei J, Nemetz K, Frandsen J, Soto J, Wride N, et al. Central leptin signaling is required to normalize myocardial fatty acid oxidation rates in caloric-restricted ob/ob mice. *Diabetes*. 2011;60:1424-34.
- [174] McGaffin KR, Sun CK, Rager JJ, Romano LC, Zou B, Mathier MA, et al. Leptin signalling reduces the severity of cardiac dysfunction and remodelling after chronic ischaemic injury. *Cardiovasc Res*. 2008;77:54-63.
- [175] Dobaczewski M, Frangogiannis NG. The cellular specificity of leptin-mediated actions in the infarcted heart. *Cardiovasc Res*. 2011;89:9-11.
- [176] Ren J, Dong F, Cai GJ, Zhao P, Nunn JM, Wold LE, et al. Interaction between age and obesity on cardiomyocyte contractile function: role of leptin and stress signaling. *PLoS One*. 2010;5:e10085.
- [177] Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, Ebihara K, Satoh N, Iwai H, et al. Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J Clin Invest*. 2000;105:1243-52.
- [178] Bełtowski J. Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension. *J Hypertens*. 2006;24:789-801.
- [179] Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 1999;341:1097-105.
- [180] Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404:635-43.
- [181] Weigle DS. Appetite and the regulation of body composition. *FASEB J*. 1994;8:302-10.
- [182] Kuczmarski RJ, Flegal KM, Campbell SM, Johnson CL. Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *JAMA*. 1994;272:205-11.
- [183] Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Hankinson SE, et al. Body weight and mortality among women. *N Engl J Med*. 1995;333:677-85.
- [184] Troiano RP, Flegal KM. Overweight children and adolescents: description, epidemiology, and demographics. *Pediatrics*. 1998;101:497-504.
- [185] Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 1996;382:250-2.
- [186] Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997;387:903-8.
- [187] Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 1995;269:540-3.
- [188] Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1995;1:1155-61.
- [189] Ravussin E, Smith SR, Mitchell JA, Shringarpure R, Shan K, Maier H, et al. Enhanced weight loss with pramlintide/metreleptin: an integrated neurohormonal approach to obesity pharmacotherapy. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17:1736-43.
- [190] Oral EA, Chan JL. Rationale for leptin-replacement therapy for severe lipodystrophy. *Endocr Pract*. 2010;16:324-33.
- [191] Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334:292-5.
- [192] Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, Heymsfield SB, Gallagher D, Chu F, et al. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:3424-7.
- [193] Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1995;1:1311-4.
- [194] Scarpace PJ, Zhang Y. Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296:R493-500.

- [195] Robertson SA, Leininger GM, Myers MG. Molecular and neural mediators of leptin action. *Physiol Behav.* 2008;94:637-42.
- [196] Münzberg H, Flier JS, Bjørbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology.* 2004;145:4880-9.
- [197] Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science.* 1999;283:1544-8.
- [198] Klamann LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 2000;20:5479-89.
- [199] Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab.* 2009;9:35-51.
- [200] Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell.* 2008;135:61-73.
- [201] Ogimoto K, Harris MK, Wisse BE. MyD88 is a key mediator of anorexia, but not weight loss, induced by lipopolysaccharide and interleukin-1 β . *Endocrinology.* 2006;147:4445-53.
- [202] Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature.* 1998;392:398-401.
- [203] Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med.* 1990;322:1483-7.
- [204] Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science.* 1996;274:1704-7.
- [205] Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature.* 1997;385:165-8.
- [206] Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, et al. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron.* 1998;21:1375-85.
- [207] Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet.* 1998;19:155-7.
- [208] Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 1998;92:829-39.
- [209] Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet.* 1998;20:111-2.
- [210] Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet.* 1998;20:113-4.
- [211] Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med.* 1996;2:589-93.
- [212] Myers MG, Leibel RL, Seeley RJ, Schwartz MW. Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21:643-51.
- [213] Kalil GZ, Haynes WG. Sympathetic nervous system in obesity-related hypertension: mechanisms and clinical implications. *Hypertens Res.* 2012;35:4-16.
- [214] Belin de Chantemèle EJ, Mintz JD, Rainey WE, Stepp DW. Impact of leptin-mediated sympatho-activation on cardiovascular function in obese mice. *Hypertension.* 2011;58:271-9.
- [215] Prior LJ, Eikelis N, Armitage JA, Davern PJ, Burke SL, Montani JP, et al. Exposure to a high-fat diet alters leptin sensitivity and elevates renal sympathetic nerve activity and arterial pressure in rabbits. *Hypertension.* 2010;55:862-8.
- [216] Guzman-Ruiz R, Gomez-Hurtado N, Delgado C, Gonzalez-Martin C, Gil-Ortega M, Somoza B, et al. LONG-TERM EXPOSURE TO HIGH FAT DIET PROMOTES GLYCOGEN BUT NOT LIPID ACCUMULATION IN HEART. *Hypertension.* 2009;54:1184-.
- [217] Stucchi P, Guzmán-Ruiz R, Gil-Ortega M, Merino B, Somoza B, Cano V, et al. Leptin resistance develops spontaneously in mice during adult life in a tissue-specific manner. Consequences for hepatic steatosis. *Biochimie.* 2011;93:1779-85.
- [218] Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO. Untangling the heavy cardiovascular burden of obesity. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008;5:428-9.

- [219] Romero-Corral A, Sierra-Johnson J, Lopez-Jimenez F, Thomas RJ, Singh P, Hoffmann M, et al. Relationships between leptin and C-reactive protein with cardiovascular disease in the adult general population. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5:418-25.
- [220] Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:2696-8.
- [221] Frayn KN. Obesity and metabolic disease: is adipose tissue the culprit? *Proc Nutr Soc*. 2005;64:7-13.
- [222] McGill HC, McMahan CA, Herderick EE, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, et al. Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation*. 2002;105:2712-8.
- [223] VAGUE J. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr*. 1956;4:20-34.
- [224] Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364:937-52.
- [225] Brochu M, Starling RD, Tchernof A, Matthews DE, Garcia-Rubi E, Poehlman ET. Visceral adipose tissue is an independent correlate of glucose disposal in older obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2378-84.
- [226] McFarlane SI, Banerji M, Sowers JR. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:713-8.
- [227] Rimm EB, Stampfer MJ, Giovannucci E, Ascherio A, Spiegelman D, Colditz GA, et al. Body size and fat distribution as predictors of coronary heart disease among middle-aged and older US men. *Am J Epidemiol*. 1995;141:1117-27.
- [228] Assimacopoulos-Jeannet F. Fat storage in pancreas and in insulin-sensitive tissues in pathogenesis of type 2 diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28 Suppl 4:S53-7.
- [229] James WP. Assessing obesity: are ethnic differences in body mass index and waist classification criteria justified? *Obes Rev*. 2005;6:179-81.
- [230] Wannamethee SG, Shaper AG. Weight change and duration of overweight and obesity in the incidence of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 1999;22:1266-72.
- [231] Vinik AI. The metabolic basis of atherogenic dyslipidemia. *Clin Cornerstone*. 2005;7:27-35.
- [232] Bamba V, Rader DJ. Obesity and atherogenic dyslipidemia. *Gastroenterology*. 2007;132:2181-90.
- [233] Wee CC, Mukamal KJ, Huang A, Davis RB, McCarthy EP, Mittleman MA. Obesity and C-reactive protein levels among white, black, and hispanic US adults. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16:875-80.
- [234] Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:434-9.
- [235] Lakka HM, Lakka TA, Tuomilehto J, Salonen JT. Abdominal obesity is associated with increased risk of acute coronary events in men. *Eur Heart J*. 2002;23:706-13.
- [236] Vigili de Kreutzenberg S, Kiwanuka E, Tiengo A, Avogaro A. Visceral obesity is characterized by impaired nitric oxide-independent vasodilation. *Eur Heart J*. 2003;24:1210-5.
- [237] Boden G, Song WW. Effects of insulin and free fatty acids on matrix metalloproteinases. *Curr Diab Rep*. 2008;8:239-42.
- [238] Alpert MA. Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. *Am J Med Sci*. 2001;321:225-36.
- [239] Messerli FH, Ventura HO, Reisin E, Dreslinski GR, Dunn FG, MacPhee AA, et al. Borderline hypertension and obesity: two prehypertensive states with elevated cardiac output. *Circulation*. 1982;66:55-60.
- [240] Messerli FH, Nunez BD, Ventura HO, Snyder DW. Overweight and sudden death. Increased ventricular ectopy in cardiopathy of obesity. *Arch Intern Med*. 1987;147:1725-8.
- [241] Messerli FH. Cardiopathy of obesity--a not-so-Victorian disease. *N Engl J Med*. 1986;314:378-80.
- [242] Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO, Cardenas GA, Mehra MR, Messerli FH. Disparate effects of left ventricular geometry and obesity on mortality in patients with preserved left ventricular ejection fraction. *Am J Cardiol*. 2007;100:1460-4.
- [243] Lavie CJ, Amodio C, Ventura HO, Messerli FH. Left atrial abnormalities indicating diastolic ventricular dysfunction in cardiopathy of obesity. *Chest*. 1987;92:1042-6.

- [244] Wang TJ, Parise H, Levy D, D'Agostino RB, Wolf PA, Vasan RS, et al. Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. *JAMA*. 2004;292:2471-7.
- [245] Chakko S, Mayor M, Allison MD, Kessler KM, Materson BJ, Myerburg RJ. Abnormal left ventricular diastolic filling in eccentric left ventricular hypertrophy of obesity. *Am J Cardiol*. 1991;68:95-8.
- [246] Garavaglia GE, Messerli FH, Nunez BD, Schmieder RE, Grossman E. Myocardial contractility and left ventricular function in obese patients with essential hypertension. *Am J Cardiol*. 1988;62:594-7.
- [247] Alpert MA, Terry BE, Mulekar M, Cohen MV, Massey CV, Fan TM, et al. Cardiac morphology and left ventricular function in normotensive morbidly obese patients with and without congestive heart failure, and effect of weight loss. *Am J Cardiol*. 1997;80:736-40.
- [248] Davos CH, Doehner W, Rauchhaus M, Ciccoira M, Francis DP, Coats AJ, et al. Body mass and survival in patients with chronic heart failure without cachexia: the importance of obesity. *J Card Fail*. 2003;9:29-35.
- [249] Uretsky S, Messerli FH, Bangalore S, Champion A, Cooper-Dehoff RM, Zhou Q, et al. Obesity paradox in patients with hypertension and coronary artery disease. *Am J Med*. 2007;120:863-70.
- [250] Wassertheil-Smoller S, Fann C, Allman RM, Black HR, Camel GH, Davis B, et al. Relation of low body mass to death and stroke in the systolic hypertension in the elderly program. The SHEP Cooperative Research Group. *Arch Intern Med*. 2000;160:494-500.
- [251] Stamler R, Ford CE, Stamler J. Why do lean hypertensives have higher mortality rates than other hypertensives? Findings of the Hypertension Detection and Follow-up Program. *Hypertension*. 1991;17:553-64.
- [252] Tuomilehto J. Body mass index and prognosis in elderly hypertensive patients: a report from the European Working Party on High Blood Pressure in the Elderly. *Am J Med*. 1991;90:345-415.
- [253] Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO. Obesity, heart disease, and favorable prognosis--truth or paradox? *Am J Med*. 2007;120:825-6.
- [254] Horwich TB, Fonarow GC, Hamilton MA, MacLellan WR, Woo MA, Tillisch JH. The relationship between obesity and mortality in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:789-95.
- [255] Oreopoulos A, Padwal R, Kalantar-Zadeh K, Fonarow GC, Norris CM, McAlister FA. Body mass index and mortality in heart failure: a meta-analysis. *Am Heart J*. 2008;156:13-22.
- [256] Fonarow GC, Srikanthan P, Costanzo MR, Cintron GB, Lopatin M, Investigators ASACa. An obesity paradox in acute heart failure: analysis of body mass index and in-hospital mortality for 108,927 patients in the Acute Decompensated Heart Failure National Registry. *Am Heart J*. 2007;153:74-81.
- [257] Lavie CJ, Osman AF, Milani RV, Mehra MR. Body composition and prognosis in chronic systolic heart failure: the obesity paradox. *Am J Cardiol*. 2003;91:891-4.
- [258] Lavie CJ, Mehra MR, Milani RV. Obesity and heart failure prognosis: paradox or reverse epidemiology? *Eur Heart J*. 2005;26:5-7.
- [259] Kalantar-Zadeh K, Block G, Horwich T, Fonarow GC. Reverse epidemiology of conventional cardiovascular risk factors in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1439-44.
- [260] Anker SD, Negassa A, Coats AJ, Afzal R, Poole-Wilson PA, Cohn JN, et al. Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. *Lancet*. 2003;361:1077-83.
- [261] Mohamed-Ali V, Goodrick S, Bulmer K, Holly JM, Yudkin JS, Coppack SW. Production of soluble tumor necrosis factor receptors by human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Am J Physiol*. 1999;277:E971-5.
- [262] Mehra MR, Uber PA, Park MH, Scott RL, Ventura HO, Harris BC, et al. Obesity and suppressed B-type natriuretic peptide levels in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1590-5.
- [263] Lavie CJ, Milani RV. Obesity and cardiovascular disease: the hippocrates paradox? *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:677-9.
- [264] Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1983;67:968-77.
- [265] Lavie CJ, Milani RV. Cardiac rehabilitation and exercise training programs in metabolic syndrome and diabetes. *J Cardiopulm Rehabil*. 2005;25:59-66.
- [266] Romero-Corral A, Montori VM, Somers VK, Korinek J, Thomas RJ, Allison TG, et al. Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies. *Lancet*. 2006;368:666-78.

- [267] McAuley P, Myers J, Abella J, Froelicher V. Body mass, fitness and survival in veteran patients: another obesity paradox? *Am J Med.* 2007;120:518-24.
- [268] Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther.* 2010;128:191-227.
- [269] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009;324:98-102.
- [270] Kajstura J, Rota M, Cappelletta D, Ogórek B, Arranto C, Bai Y, et al. Cardiomyogenesis in the aging and failing human heart. *Circulation.* 2012;126:1869-81.
- [271] Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:589-600.
- [272] van Berlo JH, Maillet M, Molkentin JD. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J Clin Invest.* 2013;123:37-45.
- [273] Dorn GW. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension.* 2007;49:962-70.
- [274] !!! INVALID CITATION !!!
- [275] Zak R. Cardiac hypertrophy: biochemical and cellular relationships. *Hosp Pract (Off Ed).* 1983;18:85-97.
- [276] Nag AC, Zak R. Dissociation of adult mammalian heart into single cell suspension: an ultrastructural study. *J Anat.* 1979;129:541-59.
- [277] Popescu LM, Gherghiceanu M, Hinescu ME, Cretoiu D, Ceafalan L, Regalia T, et al. Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC). *J Cell Mol Med.* 2006;10:429-58.
- [278] Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M, Field LJ. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol.* 1996;271:H2183-9.
- [279] Noorman M, van der Heyden MA, van Veen TA, Cox MG, Hauer RN, de Bakker JM, et al. Cardiac cell-cell junctions in health and disease: Electrical versus mechanical coupling. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47:23-31.
- [280] Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:45-79.
- [281] Olson EN, Williams RS. Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell.* 2000;101:689-92.
- [282] Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell.* 2002;109 Suppl:S67-79.
- [283] Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 1998;93:215-28.
- [284] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002;296:1655-7.
- [285] Schlüter KD, Goldberg Y, Taimor G, Schäfer M, Piper HM. Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation in the hypertrophic growth of adult ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 1998;40:174-81.
- [286] Chesley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao RP, Ohtani S, Lakatta EG, et al. The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res.* 2000;87:1172-9.
- [287] Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:1607-12.
- [288] Naga Prasad SV, Esposito G, Mao L, Koch WJ, Rockman HA. Gbetagamma-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy. *J Biol Chem.* 2000;275:4693-8.
- [289] Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM, Lawitts J, et al. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* 2000;19:2537-48.
- [290] Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* 1997;7:261-9.
- [291] Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, et al. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 2002;22:2799-809.
- [292] Matsui T, Li L, Wu JC, Cook SA, Nagoshi T, Picard MH, et al. Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J Biol Chem.* 2002;277:22896-901.

- [293] DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation*. 2006;113:2097-104.
- [294] McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, et al. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12355-60.
- [295] Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev*. 2002;16:1472-87.
- [296] Tu VC, Bahl JJ, Chen QM. Signals of oxidant-induced cardiomyocyte hypertrophy: key activation of p70 S6 kinase-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300:1101-10.
- [297] Boluyt MO, Zheng JS, Younes A, Long X, O'Neill L, Silverman H, et al. Rapamycin inhibits alpha 1-adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte hypertrophy but not activation of hypertrophy-associated genes. Evidence for involvement of p70 S6 kinase. *Circ Res*. 1997;81:176-86.
- [298] Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling. *Circ Res*. 1995;76:1-15.
- [299] Ono Y, Ito H, Tamamori M, Nozato T, Adachi S, Abe S, et al. Role and relation of p70 S6 and extracellular signal-regulated kinases in the phenotypic changes of hypertrophy of cardiac myocytes. *Jpn Circ J*. 2000;64:695-700.
- [300] Zhou P, Sun LJ, Dötsch V, Wagner G, Verdine GL. Solution structure of the core NFATC1/DNA complex. *Cell*. 1998;92:687-96.
- [301] Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, Angel P, Woodgett JR, Karin M, et al. Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell*. 1991;64:573-84.
- [302] Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev*. 2000;14:2501-14.
- [303] Ginger RS, Dalton EC, Ryves WJ, Fukuzawa M, Williams JG, Harwood AJ. Glycogen synthase kinase-3 enhances nuclear export of a Dictyostelium STAT protein. *EMBO J*. 2000;19:5483-91.
- [304] Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*. 2000;406:86-90.
- [305] Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev*. 1997;11:1061-72.
- [306] Liang Q, De Windt LJ, Witt SA, Kimball TR, Markham BE, Molkentin JD. The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2001;276:30245-53.
- [307] Morisco C, Seta K, Hardt SE, Lee Y, Vatner SF, Sadoshima J. Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2001;276:28586-97.
- [308] Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:769-76.
- [309] McKinsey TA, Olson EN. Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Dev*. 1999;9:267-74.
- [310] Houser SR, Piacentino V, Weissner J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:1595-607.
- [311] McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci*. 2002;27:40-7.
- [312] Naya FJ, Wu C, Richardson JA, Overbeek P, Olson EN. Transcriptional activity of MEF2 during mouse embryogenesis monitored with a MEF2-dependent transgene. *Development*. 1999;126:2045-52.
- [313] McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Mol Cell Biol*. 2001;21:6312-21.
- [314] Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, Antos CL, Hill JA, Olson EN. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell*. 2002;110:479-88.
- [315] Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, et al. CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest*. 2000;105:1395-406.

- [316] Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, et al. The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem*. 2002;277:1261-7.
- [317] Colomer JM, Means AR. Chronic elevation of calmodulin in the ventricles of transgenic mice increases the autonomous activity of calmodulin-dependent protein kinase II, which regulates atrial natriuretic factor gene expression. *Mol Endocrinol*. 2000;14:1125-36.
- [318] Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*. 2002;415:206-12.
- [319] Nicol RL, Frey N, Olson EN. From the sarcomere to the nucleus: role of genetics and signaling in structural heart disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:179-223.
- [320] Koch WJ, Lefkowitz RJ, Rockman HA. Functional consequences of altering myocardial adrenergic receptor signaling. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:237-60.
- [321] Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:931-6.
- [322] D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB, et al. Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:8121-6.
- [323] Sakata Y, Hoit BD, Liggett SB, Walsh RA, Dorn GW. Decompensation of pressure-overload hypertrophy in G alpha q-overexpressing mice. *Circulation*. 1998;97:1488-95.
- [324] Offermanns S, Zhao LP, Gohla A, Sarosi I, Simon MI, Wilkie TM. Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice. *EMBO J*. 1998;17:4304-12.
- [325] Wettschureck N, Rütten H, Zywiets A, Gehring D, Wilkie TM, Chen J, et al. Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galpha11 in cardiomyocytes. *Nat Med*. 2001;7:1236-40.
- [326] Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, Iaccarino G, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science*. 1998;280:574-7.
- [327] Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 2000;342:145-53.
- [328] Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*. 1997;390:88-91.
- [329] Engelhardt S, Hein L, Keller U, Klämbt K, Lohse MJ. Inhibition of Na(+)-H(+) exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *Circ Res*. 2002;90:814-9.
- [330] Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, Pende A, Reynolds MV, Sastravaha A, et al. Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:817-30.
- [331] Roth DM, Gao MH, Lai NC, Drumm J, Dalton N, Zhou JY, et al. Cardiac-directed adenylyl cyclase expression improves heart function in murine cardiomyopathy. *Circulation*. 1999;99:3099-102.
- [332] Roth DM, Bayat H, Drumm JD, Gao MH, Swaney JS, Ander A, et al. Adenylyl cyclase increases survival in cardiomyopathy. *Circulation*. 2002;105:1989-94.
- [333] Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, et al. Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ Res*. 2001;89:997-1004.
- [334] Neumann J, Schmitz W, Scholz H, von Meyerinck L, Döring V, Kalmar P. Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure. *Lancet*. 1988;2:936-7.
- [335] Eschenhagen T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Haverich A, et al. Increased messenger RNA level of the inhibitory G protein alpha subunit Gi alpha-2 in human end-stage heart failure. *Circ Res*. 1992;70:688-96.
- [336] Böhm M, Gierschik P, Knorr A, Schmidt U, Weismann K, Erdmann E. Cardiac adenylyl cyclase, beta-adrenergic receptors, and G proteins in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*. 1993;22:715-27.
- [337] Redfern CH, Degtyarev MY, Kwa AT, Salomonis N, Cotte N, Nanevicz T, et al. Conditional expression of a Gi-coupled receptor causes ventricular conduction delay and a lethal cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:4826-31.

- [338] Clerk A, Sugden PH. Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circ Res*. 2000;86:1019-23.
- [339] Hunter JJ, Tanaka N, Rockman HA, Ross J, Chien KR. Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J Biol Chem*. 1995;270:23173-8.
- [340] Fuller SJ, Gillespie-Brown J, Sugden PH. Oncogenic src, raf, and ras stimulate a hypertrophic pattern of gene expression and increase cell size in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 1998;273:18146-52.
- [341] Ichida M, Finkel T. Ras regulates NFAT3 activity in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2001;276:3524-30.
- [342] Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 1998;279:509-14.
- [343] Hoshijima M, Sah VP, Wang Y, Chien KR, Brown JH. The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes. Involvement of Rho kinase. *J Biol Chem*. 1998;273:7725-30.
- [344] Aoki H, Sadoshima J, Izumo S. Myosin light chain kinase mediates sarcomere organization during cardiac hypertrophy in vitro. *Nat Med*. 2000;6:183-8.
- [345] Wu G, Yussman MG, Barrett TJ, Hahn HS, Osinska H, Hilliard GM, et al. Increased myocardial Rab GTPase expression: a consequence and cause of cardiomyopathy. *Circ Res*. 2001;89:1130-7.
- [346] Clerk A, Michael A, Sugden PH. Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol*. 1998;142:523-35.
- [347] Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM, Sale GJ, Fuller SJ, Sugden PH. Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 1996;78:954-61.
- [348] Post GR, Goldstein D, Thuerauf DJ, Glembotski CC, Brown JH. Dissociation of p44 and p42 mitogen-activated protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 1996;271:8452-7.
- [349] Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, et al. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J*. 2000;19:6341-50.
- [350] Komuro I, Kudo S, Yamazaki T, Zou Y, Shiojima I, Yazaki Y. Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. *FASEB J*. 1996;10:631-6.
- [351] Choukroun G, Hajjar R, Kyriakis JM, Bonventre JV, Rosenzweig A, Force T. Role of the stress-activated protein kinases in endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 1998;102:1311-20.
- [352] Yano M, Kim S, Izumi Y, Yamanaka S, Iwao H. Differential activation of cardiac c-jun amino-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase in angiotensin II-mediated hypertension. *Circ Res*. 1998;83:752-60.
- [353] Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, et al. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res*. 1996;79:162-73.
- [354] Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J, Brown JH, Han J, et al. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem*. 1998;273:2161-8.
- [355] Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature*. 1997;386:296-9.
- [356] Yang TT, Xiong Q, Enslen H, Davis RJ, Chow CW. Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol*. 2002;22:3892-904.
- [357] Bowman JC, Steinberg SF, Jiang T, Geenen DL, Fishman GI, Buttrick PM. Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J Clin Invest*. 1997;100:2189-95.
- [358] Roman BB, Geenen DL, Leitges M, Buttrick PM. PKC-beta is not necessary for cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H2264-70.
- [359] Hoshijima M, Chien KR. Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J Clin Invest*. 2002;109:849-55.

- [360] Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T. A novel role for STAT3 in cardiac remodeling. *Trends Cardiovasc Med*. 2000;10:298-303.
- [361] Kunisada K, Tone E, Fujio Y, Matsui H, Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T. Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiac myocytes. *Circulation*. 1998;98:346-52.
- [362] Kunisada K, Negoro S, Tone E, Funamoto M, Osugi T, Yamada S, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:315-9.
- [363] Lee RT. Matrix metalloproteinase inhibition and the prevention of heart failure. *Trends Cardiovasc Med*. 2001;11:202-5.
- [364] Asakura M, Kitakaze M, Takashima S, Liao Y, Ishikura F, Yoshinaka T, et al. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med*. 2002;8:35-40.
- [365] Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:339-43.
- [366] Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J*. 1991;5:3037-46.
- [367] MacLellan WR, Schneider MD. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:289-319.
- [368] Morkin E. Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc Res Tech*. 2000;50:522-31.
- [369] Swynghedauw B. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol Rev*. 1986;66:710-71.
- [370] Izumo S, Lompré AM, Matsuoka R, Koren G, Schwartz K, Nadal-Ginard B, et al. Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest*. 1987;79:970-7.
- [371] Dorn GW, Robbins J, Ball N, Walsh RA. Myosin heavy chain regulation and myocyte contractile depression after LV hypertrophy in aortic-banded mice. *Am J Physiol*. 1994;267:H400-5.
- [372] Antos CL, McKinsey TA, Frey N, Kutschke W, McAnally J, Shelton JM, et al. Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:907-12.
- [373] Levy D, Labib SB, Anderson KM, Christiansen JC, Kannel WB, Castelli WP. Determinants of sensitivity and specificity of electrocardiographic criteria for left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 1990;81:815-20.
- [374] Weber KT, Brilla CG. Structural basis for pathologic left ventricular hypertrophy. *Clin Cardiol*. 1993;16:II10-4.
- [375] Ferrans VJ, Rodríguez ER. Specificity of light and electron microscopic features of hypertrophic obstructive and nonobstructive cardiomyopathy. Qualitative, quantitative and etiologic aspects. *Eur Heart J*. 1983;4 Suppl F:9-22.
- [376] Schaible TF, Ciambone GJ, Capasso JM, Scheuer J. Cardiac conditioning ameliorates cardiac dysfunction associated with renal hypertension in rats. *J Clin Invest*. 1984;73:1086-94.
- [377] Fagard RH. Impact of different sports and training on cardiac structure and function. *Cardiol Clin*. 1997;15:397-412.
- [378] Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*. 1975;56:56-64.
- [379] Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, van der Wall EE. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation*. 2000;101:336-44.
- [380] Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y, et al. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res*. 2005;96:1208-16.
- [381] van der Vusse GJ, Glatz JF, Stam HC, Reneman RS. Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev*. 1992;72:881-940.
- [382] Allard MF, Schönekeess BO, Henning SL, English DR, Lopaschuk GD. Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am J Physiol*. 1994;267:H742-50.
- [383] Christie ME, Rodgers RL. Altered glucose and fatty acid oxidation in hearts of the spontaneously hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26:1371-5.
- [384] Dávila-Román VG, Vedala G, Herrero P, de las Fuentes L, Rogers JG, Kelly DP, et al. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:271-7.

- [385] van Bilsen M, van Nieuwenhoven FA, van der Vusse GJ. Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res.* 2009;81:420-8.
- [386] Gertz EW, Wisneski JA, Stanley WC, Neese RA. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *J Clin Invest.* 1988;82:2017-25.
- [387] Wikman-Coffelt J, Parmley WW, Mason DT. The cardiac hypertrophy process. Analyses of factors determining pathological vs. physiological development. *Circ Res.* 1979;45:697-707.
- [388] Rupp H. The adaptive changes in the isoenzyme pattern of myosin from hypertrophied rat myocardium as a result of pressure overload and physical training. *Basic Res Cardiol.* 1981;76:79-88.
- [389] Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Kobayashi T, Fujii N, et al. Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;281:R2029-36.
- [390] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3:e442.
- [391] Bénitah JP, Gomez AM, Bailly P, Da Ponte JP, Berson G, Delgado C, et al. Heterogeneity of the early outward current in ventricular cells isolated from normal and hypertrophied rat hearts. *J Physiol.* 1993;469:111-38.
- [392] Gómez AM, Benitah JP, Henzel D, Vinet A, Lorente P, Delgado C. Modulation of electrical heterogeneity by compensated hypertrophy in rat left ventricle. *Am J Physiol.* 1997;272:H1078-86.
- [393] Martínez ML, Heredia MP, Delgado C. Expression of T-type Ca(2+) channels in ventricular cells from hypertrophied rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:1617-25.
- [394] Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol.* 2000;525 Pt 2:285-98.
- [395] Escande D, Loisanche D, Planche C, Coraboeuf E. Age-related changes of action potential plateau shape in isolated human atrial fibers. *Am J Physiol.* 1985;249:H843-50.
- [396] Antzelevitch C, Fish J. Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res Cardiol.* 2001;96:517-27.
- [397] Tseng GN, Hoffman BF. Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. *Circ Res.* 1989;64:633-47.
- [398] Xu H, Guo W, Nerbonne JM. Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol.* 1999;113:661-78.
- [399] Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated K⁺ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol.* 1991;97:973-1011.
- [400] Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ Res.* 1996;78:689-96.
- [401] Coraboeuf E, Carmeliet E. Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflugers Arch.* 1982;392:352-9.
- [402] Walsh KB. Activation of a heart chloride current during stimulation of protein kinase C. *Mol Pharmacol.* 1991;40:342-6.
- [403] Zygmunt AC, Gibbons WR. Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res.* 1991;68:424-37.
- [404] Ackerman MJ, Clapham DE. Cardiac chloride channels. *Trends Cardiovasc Med.* 1993;3:23-8.
- [405] Matsuura H, Ehara T. Activation of chloride current by purinergic stimulation in guinea pig heart cells. *Circ Res.* 1992;70:851-5.
- [406] DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C. Properties of the hyperpolarizing-activated current (I_h) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol.* 1986;377:61-88.
- [407] Brown DW, Giles WH, Croft JB. Left ventricular hypertrophy as a predictor of coronary heart disease mortality and the effect of hypertension. *Am Heart J.* 2000;140:848-56.
- [408] Armondas AA, Wu R, Juang G, Marbán E, Tomaselli GF. Electrical and structural remodeling of the failing ventricle. *Pharmacol Ther.* 2001;92:213-30.
- [409] Hart G. Cellular electrophysiology in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res.* 1994;28:933-46.
- [410] Näbauer M, Käb S. Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998;37:324-34.

- [411] Wickenden AD, Kaprielian R, Kassiri Z, Tsoporis JN, Tsushima R, Fishman GI, et al. The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. *Cardiovasc Res*. 1998;37:312-23.
- [412] Mukherjee R, Spinale FG. L-type calcium channel abundance and function with cardiac hypertrophy and failure: a review. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:1899-916.
- [413] Wang Z, Kutschke W, Richardson KE, Karimi M, Hill JA. Electrical remodeling in pressure-overload cardiac hypertrophy: role of calcineurin. *Circulation*. 2001;104:1657-63.
- [414] Hasenfuss G, Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:951-69.
- [415] Vlahos CJ, McDowell SA, Clerk A. Kinases as therapeutic targets for heart failure. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2:99-113.
- [416] Boerth SR, Zimmer DB, Artman M. Steady-state mRNA levels of the sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger peak near birth in developing rabbit and rat hearts. *Circ Res*. 1994;74:354-9.
- [417] Philipson KD, Nicoll DA. Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:111-33.
- [418] Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 1999;85:38-46.
- [419] Schillinger W, Janssen PM, Emami S, Henderson SA, Ross RS, Teucher N, et al. Impaired contractile performance of cultured rabbit ventricular myocytes after adenoviral gene transfer of Na(+)-Ca(2+) exchanger. *Circ Res*. 2000;87:581-7.
- [420] Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM. Upregulation of Na(+)/Ca(2+) exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res*. 1999;85:1009-19.
- [421] Sipido KR, Volders PG, de Groot SH, Verdonck F, Van de Werf F, Wellens HJ, et al. Enhanced Ca(2+) release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. *Circulation*. 2000;102:2137-44.
- [422] Zygmunt AC, Goodrow RJ, Antzelevitch C. I(NaCa) contributes to electrical heterogeneity within the canine ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H1671-8.
- [423] Wang Z, Nolan B, Kutschke W, Hill JA. Na⁺-Ca²⁺ exchanger remodeling in pressure overload cardiac hypertrophy. *J Biol Chem*. 2001;276:17706-11.
- [424] UHLEY HN. Study of the transmembrane action potential, electrogram, electrocardiogram and vectorcardiogram of rats with left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol*. 1961;7:211-7.
- [425] Bassett AL, Gelband H. Chronic partial occlusion of the pulmonary artery in cats. Change in ventricular action potential configuration during early hypertrophy. *Circ Res*. 1973;32:15-26.
- [426] Bassett AL, Gelband H. Electrical and mechanical properties of cardiac muscle during chronic right ventricular pressure overload. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*. 1974;4:3-20.
- [427] Brahmajothi MV, Campbell DL, Rasmusson RL, Morales MJ, Trimmer JS, Nerbonne JM, et al. Distinct transient outward potassium current (I_{to}) phenotypes and distribution of fast-inactivating potassium channel alpha subunits in ferret left ventricular myocytes. *J Gen Physiol*. 1999;113:581-600.
- [428] Guo W, Li H, Aimond F, Johns DC, Rhodes KJ, Trimmer JS, et al. Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K⁺ currents. *Circ Res*. 2002;90:586-93.
- [429] Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*. 2005;85:1205-53.
- [430] Heath BM, Xia J, Dong E, An RH, Brooks A, Liang C, et al. Overexpression of nerve growth factor in the heart alters ion channel activity and beta-adrenergic signalling in an adult transgenic mouse. *J Physiol*. 1998;512 (Pt 3):779-91.
- [431] Ojamaa K, Kenessey A, Shenoy R, Klein I. Thyroid hormone metabolism and cardiac gene expression after acute myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279:E1319-24.
- [432] Matsubara H, Suzuki J, Inada M. Shaker-related potassium channel, Kv1.4, mRNA regulation in cultured rat heart myocytes and differential expression of Kv1.4 and Kv1.5 genes in myocardial development and hypertrophy. *J Clin Invest*. 1993;92:1659-66.
- [433] Fabiato A. Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol*. 1985;85:291-320.
- [434] Fabiato A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol*. 1985;85:247-89.

- [435] Stern MD. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys J*. 1992;63:497-517.
- [436] Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*. 1993;262:740-4.
- [437] Wier WG, Balke CW. Ca^{2+} release mechanisms, Ca^{2+} sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle. *Circ Res*. 1999;85:770-6.
- [438] Santana LF, Cheng H, Gómez AM, Cannell MB, Lederer WJ. Relation between the sarcolemmal Ca^{2+} current and Ca^{2+} sparks and local control theories for cardiac excitation-contraction coupling. *Circ Res*. 1996;78:166-71.
- [439] Cannell MB, Cheng H, Lederer WJ. Spatial non-uniformities in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Biophys J*. 1994;67:1942-56.
- [440] Ritter M, Su Z, Spitzer KW, Ishida H, Barry WH. Caffeine-induced Ca^{2+} sparks in mouse ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H666-9.
- [441] Gómez AM, Cheng H, Lederer WJ, Bers DM. Ca^{2+} diffusion and sarcoplasmic reticulum transport both contribute to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decline during Ca^{2+} sparks in rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 1996;496 (Pt 2):575-81.
- [442] Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT. Calmodulin is the Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron*. 1999;22:549-58.
- [443] Zühlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature*. 1999;399:159-62.
- [444] Adachi-Akahane S, Cleemann L, Morad M. Cross-signaling between L-type Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol*. 1996;108:435-54.
- [445] Scriven DR, Dan P, Moore ED. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J*. 2000;79:2682-91.
- [446] Bers DM, Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res*. 1999;42:339-60.
- [447] Ahmmed GU, Dong PH, Song G, Ball NA, Xu Y, Walsh RA, et al. Changes in Ca^{2+} cycling proteins underlie cardiac action potential prolongation in a pressure-overloaded guinea pig model with cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*. 2000;86:558-70.
- [448] Delgado C, Artilles A, Gómez AM, Vassort G. Frequency-dependent increase in cardiac Ca^{2+} current is due to reduced Ca^{2+} release by the sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:1783-93.
- [449] Barrère-Lemaire S, Piot C, Leclercq F, Nargeot J, Richard S. Facilitation of L-type calcium currents by diastolic depolarization in cardiac cells: impairment in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2000;47:336-49.
- [450] Kohmoto O, Levi AJ, Bridge JH. Relation between reverse sodium-calcium exchange and sarcoplasmic reticulum calcium release in guinea pig ventricular cells. *Circ Res*. 1994;74:550-4.
- [451] Levi AJ, Spitzer KW, Kohmoto O, Bridge JH. Depolarization-induced Ca entry via Na-Ca exchange triggers SR release in guinea pig cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1994;266:H1422-33.
- [452] Litwin SE, Li J, Bridge JH. Na-Ca exchange and the trigger for sarcoplasmic reticulum Ca release: studies in adult rabbit ventricular myocytes. *Biophys J*. 1998;75:359-71.
- [453] Sipido KR, Maes M, Van de Werf F. Low efficiency of Ca^{2+} entry through the Na^{+} - Ca^{2+} exchanger as trigger for Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum. A comparison between L-type Ca^{2+} current and reverse-mode Na^{+} - Ca^{2+} exchange. *Circ Res*. 1997;81:1034-44.
- [454] Lederer WJ, Niggli E, Hadley RW. Sodium-calcium exchange in excitable cells: fuzzy space. *Science*. 1990;248:283.
- [455] Levesque PC, Leblanc N, Hume JR. Release of calcium from guinea pig cardiac sarcoplasmic reticulum induced by sodium-calcium exchange. *Cardiovasc Res*. 1994;28:370-8.
- [456] Lipp P, Niggli E. Sodium current-induced calcium signals in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol*. 1994;474:439-46.
- [457] Sipido KR, Carmeliet E, Van de Werf F. T-type Ca^{2+} current as a trigger for Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol*. 1998;508 (Pt 2):439-51.
- [458] Zhou Z, January CT. Both T- and L-type Ca^{2+} channels can contribute to excitation-contraction coupling in cardiac Purkinje cells. *Biophys J*. 1998;74:1830-9.
- [459] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415:198-205.

- [460] Ferrier GR, Howlett SE. Cardiac excitation-contraction coupling: role of membrane potential in regulation of contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H1928-44.
- [461] Ferrier GR, Redondo IM, Mason CA, Mapplebeck C, Howlett SE. Regulation of contraction and relaxation by membrane potential in cardiac ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H1618-26.
- [462] Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Potentiation of fractional sarcoplasmic reticulum calcium release by total and free intra-sarcoplasmic reticulum calcium concentration. *Biophys J*. 2000;78:334-43.
- [463] Sitsapesan R, Williams AJ. Regulation of the gating of the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channel by luminal Ca^{2+} . *J Membr Biol*. 1994;137:215-26.
- [464] Lompré AM, Anger M, Levitsky D. Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26:1109-21.
- [465] Tada M, Katz AM. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu Rev Physiol*. 1982;44:401-23.
- [466] Brittsan AG, Kranias EG. Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:2131-9.
- [467] Cheung WY. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science*. 1980;207:19-27.
- [468] Smith JS, Rousseau E, Meissner G. Calmodulin modulation of single sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channels from cardiac and skeletal muscle. *Circ Res*. 1989;64:352-9.
- [469] Marks AR. Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *J Clin Invest*. 2013;123:46-52.
- [470] Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, Warriar S, Belevych AE, Harvey RD, et al. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell*. 2005;123:25-35.
- [471] Shan J, Kushnir A, Betzenhauser MJ, Reiken S, Li J, Lehnart SE, et al. Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:4388-98.
- [472] Shan J, Betzenhauser MJ, Kushnir A, Reiken S, Meli AC, Wronska A, et al. Role of chronic ryanodine receptor phosphorylation in heart failure and β -adrenergic receptor blockade in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:4375-87.
- [473] Andersson DC, Marks AR. Fixing ryanodine receptor Ca leak - a novel therapeutic strategy for contractile failure in heart and skeletal muscle. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2010;7:e151-e7.
- [474] Lehnart SE, Mongillo M, Bellinger A, Lindegger N, Chen BX, Hsueh W, et al. Leaky Ca^{2+} release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice. *J Clin Invest*. 2008;118:2230-45.
- [475] Lehnart SE, Terrenoire C, Reiken S, Wehrens XH, Song LS, Tillman EJ, et al. Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:7906-10.
- [476] Arai M, Alpert NR, MacLennan DH, Barton P, Periasamy M. Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. *Circ Res*. 1993;72:463-9.
- [477] Morgan JP, Erny RE, Allen PD, Grossman W, Gwathmey JK. Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. *Circulation*. 1990;81:III21-32.
- [478] Hobai IA, O'Rourke B. Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure. *Circulation*. 2001;103:1577-84.
- [479] Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. 2000;101:365-76.
- [480] Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, D'Armiento J, Burkhoff D, et al. Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem*. 2003;278:444-53.
- [481] Abel ED, Litwin SE, Sweeney G. Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev*. 2008;88:389-419.
- [482] Aiba T, Tomaselli GF. Electrical remodeling in the failing heart. *Curr Opin Cardiol*. 2010;25:29-36.

- [483] Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev.* 2007;87:425-56.
- [484] Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
- [485] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- [486] Rider OJ, Petersen SE, Francis JM, Ali MK, Hudsmith LE, Robinson MR, et al. Ventricular hypertrophy and cavity dilatation in relation to body mass index in women with uncomplicated obesity. *Heart.* 2011;97:203-8.
- [487] Soliman AT, Omar M, Assem HM, Nasr IS, Rizk MM, El Matary W, et al. Serum leptin concentrations in children with type 1 diabetes mellitus: relationship to body mass index, insulin dose, and glycemic control. *Metabolism.* 2002;51:292-6.
- [488] Hille, Bertil. *Ionic Channels of excitable membranes.* Sunderland, Massachusetts: SINAUER ASSOCIATES INC.; 1992.
- [489] Smith CC, Yellon DM. Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection. *Pharmacol Ther.* 2011;129:206-19.
- [490] Shioi T, McMullen JR, Tarnavski O, Converso K, Sherwood MC, Manning WJ, et al. Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation.* 2003;107:1664-70.
- [491] Ha T, Li Y, Gao X, McMullen JR, Shioi T, Izumo S, et al. Attenuation of cardiac hypertrophy by inhibiting both mTOR and NFkappaB activation in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2005;39:1570-80.
- [492] McMullen JR, Sherwood MC, Tarnavski O, Zhang L, Dorfman AL, Shioi T, et al. Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation.* 2004;109:3050-5.
- [493] Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci.* 2011;36:320-8.
- [494] Wang Y, Hill JA. Electrophysiological remodeling in heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:619-32.
- [495] Käb S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, et al. Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res.* 1996;78:262-73.
- [496] Käb S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, et al. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation.* 1998;98:1383-93.
- [497] Sah R, Ramirez RJ, Oudit GY, Gidrewicz D, Trivieri MG, Zobel C, et al. Regulation of cardiac excitation-contraction coupling by action potential repolarization: role of the transient outward potassium current (I_{to}). *J Physiol.* 2003;546:5-18.
- [498] Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E. Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res.* 1993;73:379-85.
- [499] Pitt GS, Dun W, Boyden PA. Remodeled cardiac calcium channels. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41:373-88.
- [500] Mukherjee R, Hewett KW, Walker JD, Basler CG, Spinale FG. Changes in L-type calcium channel abundance and function during the transition to pacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998;37:432-44.
- [501] Ouadid H, Albat B, Nargeot J. Calcium currents in diseased human cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;25:282-91.
- [502] Li GR, Lau CP, Ducharme A, Tardif JC, Nattel S. Transmural action potential and ionic current remodeling in ventricles of failing canine hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H1031-41.
- [503] Mewes T, Ravens U. L-type calcium currents of human myocytes from ventricle of non-failing and failing hearts and from atrium. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26:1307-20.
- [504] Huang B, Qin D, Deng L, Boutjdir M, E1-Sherif N. Reexpression of T-type Ca²⁺ channel gene and current in post-infarction remodeled rat left ventricle. *Cardiovasc Res.* 2000;46:442-9.
- [505] Yang KC, Tseng YT, Nerbonne JM. Exercise training and PI3K α -induced electrical remodeling is independent of cellular hypertrophy and Akt signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53:532-41.
- [506] Yang KC, Foeger NC, Marionneau C, Jay PY, McMullen JR, Nerbonne JM. Homeostatic regulation of electrical excitability in physiological cardiac hypertrophy. *J Physiol.* 2010;588:5015-32.

- [507] Yang KC, Jay PY, McMullen JR, Nerbonne JM. Enhanced cardiac PI3K α signalling mitigates arrhythmogenic electrical remodelling in pathological hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res*. 2012;93:252-62.
- [508] Shek EW, Brands MW, Hall JE. Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension*. 1998;31:409-14.
- [509] Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:23-49.
- [510] Eisner DA, Choi HS, Díaz ME, O'Neill SC, Trafford AW. Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle. *Circ Res*. 2000;87:1087-94.
- [511] Bers DM. Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes. *Front Biosci*. 2002;7:d1697-711.
- [512] Asahi M, Nakayama H, Tada M, Otsu K. Regulation of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ adenosine triphosphatase by phospholamban and sarcolipin: implication for cardiac hypertrophy and failure. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:152-7.
- [513] Bers DM. Ryanodine receptor S2808 phosphorylation in heart failure: smoking gun or red herring. *Circ Res*. 2012;110:796-9.
- [514] Xiao B, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP, et al. Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem J*. 2006;396:7-16.
- [515] Paulus WJ, Vantrimpont PJ, Shah AM. Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion. *Circulation*. 1994;89:2070-8.
- [516] Bartunek J, Shah AM, Vanderheyden M, Paulus WJ. Dobutamine enhances cardiodepressant effects of receptor-mediated coronary endothelial stimulation. *Circulation*. 1997;95:90-6.
- [517] Heymes C, Vanderheyden M, Bronzwaer JG, Shah AM, Paulus WJ. Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1999;99:3009-16.
- [518] Hare JM, Givertz MM, Creager MA, Colucci WS. Increased sensitivity to nitric oxide synthase inhibition in patients with heart failure: potentiation of beta-adrenergic inotropic responsiveness. *Circulation*. 1998;97:161-6.
- [519] Cotton JM, Kearney MT, MacCarthy PA, Grocott-Mason RM, McClean DR, Heymes C, et al. Effects of nitric oxide synthase inhibition on Basal function and the force-frequency relationship in the normal and failing human heart in vivo. *Circulation*. 2001;104:2318-23.
- [520] Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Delpón E. Cardiac electrophysiological effects of nitric oxide. *Cardiovasc Res*. 2010;87:593-600.
- [521] Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res*. 1996;79:363-80.
- [522] Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 1995;270:14582-6.
- [523] Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB, et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:14855-60.
- [524] Avraham Y, Davidi N, Porat M, Chernoguz D, Magen I, Vorobeiv L, et al. Leptin reduces infarct size in association with enhanced expression of CB2, TRPV1, SIRT-1 and leptin receptor. *Curr Neurovasc Res*. 2010;7:136-43.
- [525] Rider OJ, Petersen SE, Francis JM, Ali MK, Hudsmith LE, Robinson MR, et al. Ventricular hypertrophy and cavity dilatation in relation to body mass index in women with uncomplicated obesity. *Heart*. 2011;97:203-8.
- [526] Ren J. Leptin and hyperleptinemia - from friend to foe for cardiovascular function. *J Endocrinol*. 2004;181:1-10.
- [527] Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ, Kelly A, Shepherd J, Gaw A, et al. Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation*. 2001;104:3052-6.
- [528] Schulze PC, Kratzsch J, Linke A, Schoene N, Adams V, Gielen S, et al. Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2003;5:33-40.

- [529] Schulze PC, Kratzsch J. Leptin as a new diagnostic tool in chronic heart failure. *Clin Chim Acta*. 2005;362:1-11.
- [530] Mark AL, Shaffer RA, Correia ML, Morgan DA, Sigmund CD, Haynes WG. Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice. *J Hypertens*. 1999;17:1949-53.
- [531] Cameron VA, Ellmers LJ. Minireview: natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation. *Endocrinology*. 2003;144:2191-4.
- [532] Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*. 1997;387:673-6.
- [533] Oudit GY, Penninger JM. Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN. *Cardiovasc Res*. 2009;82:250-60.
- [534] McMullen JR, Sherwood MC, Tarnavski O, Zhang L, Dorfman AL, Shioi T, et al. Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation*. 2004;109:3050-5.
- [535] Shioi T, McMullen JR, Tarnavski O, Converso K, Sherwood MC, Manning WJ, et al. Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*. 2003;107:1664-70.
- [536] Ha T, Li Y, Gao X, McMullen JR, Shioi T, Izumo S, et al. Attenuation of cardiac hypertrophy by inhibiting both mTOR and NFkappaB activation in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2005;39:1570-80.
- [537] Babu GJ, Lalli MJ, Sussman MA, Sadoshima J, Periasamy M. Phosphorylation of elk-1 by MEK/ERK pathway is necessary for c-fos gene activation during cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:1447-57.
- [538] Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res*. 2002;91:776-81.
- [539] Yao JJ, Gao XF, Chow CW, Zhan XQ, Hu CL, Mei YA. Neuritin activates insulin receptor pathway to up-regulate Kv4.2-mediated transient outward K⁺ current in rat cerebellar granule neurons. *J Biol Chem*. 2012;287:41534-45.
- [540] Yao JJ, Sun J, Zhao QR, Wang CY, Mei YA. Neuregulin-1 /ErbB4 signaling regulates Kv4.2-mediated transient outward K⁺ current through the Akt/mTOR pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013.
- [541] Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J*. 2004;380:297-309.
- [542] Philip-Couderc P, Tavares NI, Roatti A, Lerch R, Montessuit C, Baertschi AJ. Forkhead transcription factors coordinate expression of myocardial KATP channel subunits and energy metabolism. *Circ Res*. 2008;102:e20-35.
- [543] Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J*. 2001;359:1-16.
- [544] Gong N, Bodi I, Zobel C, Schwartz A, Molkentin JD, Backx PH. Calcineurin increases cardiac transient outward K⁺ currents via transcriptional up-regulation of Kv4.2 channel subunits. *J Biol Chem*. 2006;281:38498-506.
- [545] Bassani RA. Transient outward potassium current and Ca²⁺ homeostasis in the heart: beyond the action potential. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39:393-403.
- [546] Ashrafian H, Athanasiou T, le Roux CW. Heart remodelling and obesity: the complexities and variation of cardiac geometry. *Heart*. 2011;97:171-2.
- [547] Casis O, Gallego M, Iriarte M, Sánchez-Chapula JA. Effects of diabetic cardiomyopathy on regional electrophysiologic characteristics of rat ventricle. *Diabetologia*. 2000;43:101-9.
- [548] Li X, Xu Z, Li S, Rozanski GJ. Redox regulation of Ito remodeling in diabetic rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H1417-24.
- [549] Hughes V. The big fat truth. *Nature*. 2013;497:428-30.
- [550] Wold LE, Relling DP, Duan J, Norby FL, Ren J. Abrogated leptin-induced cardiac contractile response in ventricular myocytes under spontaneous hypertension: role of Jak/STAT pathway. *Hypertension*. 2002;39:69-74.
- [551] Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, et al. Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation*. 1999;99:641-8.

- [552] Sipido KR, Volders PG, Vos MA, Verdonck F. Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovasc Res.* 2002;53:782-805.
- [553] Niggli E, Lederer WJ. Molecular operations of the sodium-calcium exchanger revealed by conformation currents. *Nature.* 1991;349:621-4.
- [554] Hampton TG, Wang JF, DeAngelis J, Amende I, Philipson KD, Morgan JP. Enhanced gene expression of Na(+)/Ca(2+) exchanger attenuates ischemic and hypoxic contractile dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H2846-54.
- [555] Ito K, Yan X, Tajima M, Su Z, Barry WH, Lorell BH. Contractile reserve and intracellular calcium regulation in mouse myocytes from normal and hypertrophied failing hearts. *Circ Res.* 2000;87:588-95.
- [556] Ding B, Price RL, Goldsmith EC, Borg TK, Yan X, Douglas PS, et al. Left ventricular hypertrophy in ascending aortic stenosis mice: anoikis and the progression to early failure. *Circulation.* 2000;101:2854-62.
- [557] Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GC, Lederer WJ. Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg²⁺ and phosphorylation. *Science.* 1995;267:1997-2000.
- [558] Mehebiek N, Jaubert AM, Sabourault D, Giudicelli Y, Ribi  re C. Leptin-induced nitric oxide production in white adipocytes is mediated through PKA and MAP kinase activation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289:C379-87.
- [559] Donato AJ, Magerko KA, Lawson BR, Durrant JR, Lesniewski LA, Seals DR. SIRT-1 and vascular endothelial dysfunction with ageing in mice and humans. *J Physiol.* 2011;589:4545-54.
- [560] Sabri A, Hughie HH, Lucchesi PA. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5:731-40.
- [561] Ferrari R, Guardigli G, Mele D, Percoco GF, Ceconi C, Curello S. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Curr Pharm Des.* 2004;10:1699-711.
- [562] Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R, Tuteja N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit.* 2009;15:RA209-19.
- [563] Dudley SC, Hoch NE, McCann LA, Honeycutt C, Diamandopoulos L, Fukai T, et al. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation.* 2005;112:1266-73.
- [564] Kawakami M, Okabe E. Superoxide anion radical-triggered Ca²⁺ release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor Ca²⁺ channel. *Mol Pharmacol.* 1998;53:497-503.
- [565] Katori T, Donzelli S, Tocchetti CG, Miranda KM, Cormaci G, Thomas DD, et al. Peroxynitrite and myocardial contractility: in vivo versus in vitro effects. *Free Radic Biol Med.* 2006;41:1606-18.
- [566] Lokuta AJ, Maertz NA, Meethal SV, Potter KT, Kamp TJ, Valdivia HH, et al. Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in human heart failure. *Circulation.* 2005;111:988-95.
- [567] Takimoto E, Champion HC, Belardi D, Moslehi J, Mongillo M, Mergia E, et al. cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism. *Circ Res.* 2005;96:100-9.
- [568] Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension.* 2007;49:241-8.
- [569] Mongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, Lissandron V, Cheung YF, Dostmann WR, et al. Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res.* 2006;98:226-34.

ANEXO I

Prolonged leptin treatment increases transient outward K^+ current via upregulation of Kv4.2 and Kv4.3 channel subunits in adult rat ventricular myocytes

Nieves Gómez-Hurtado · María Fernández-Velasco ·
María Soledad Fernández-Alfonso · Lisardo Bosca ·
Carmen Delgado

Received: 12 June 2013 / Revised: 30 August 2013 / Accepted: 30 August 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Circulating leptin levels are elevated in obesity and hyperleptinaemia has been postulated to be an independent risk factor for the development of cardiovascular diseases. Although many studies have been published on the mechanisms involved in the effects of leptin on cardiac function and pathological remodeling, scarce information is currently available analyzing the influence of prolonged leptin treatment on ionic cardiac channels remodeling in adult ventricular myocytes. Enzymatically isolated adult rat ventricular myocytes were treated with leptin or vehicle for 48h. Real-Time RT-PCR were

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00424-013-1348-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Gómez-Hurtado · C. Delgado
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain

M. Fernández-Velasco
Instituto de Investigación Hospital La Paz, IdiPAZ, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain

M. S. Fernández-Alfonso
Instituto Pluridisciplinar-Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

L. Bosca
Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (Centro Mixto CSIC-UAM), Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain

C. Delgado
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu s/n, 28040 Madrid, Spain

C. Delgado (✉)
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, s/n, 28040 Madrid, Spain
e-mail: cdelgado@med.ucm.es

used to analyze mRNA expression of Kir2.1, Cav1.2, Cav 3.1, Kv4.2 and Kv4.3 α -subunits and KCHIP2 auxiliary subunit. The fast transient outward potassium channels (I_{tof}) α -subunits Kv4.2, Kv4.3 and KCHIP2 were analyzed by Western-blot. The fast transient outward potassium current and the action potentials were recorded in isolated myocytes by the whole-cell patch-clamp technique. Leptin treatment induced an up-regulation of Kv4.2, Kv4.3 and KCHIP2 subunits mRNA expression. However, transcriptional levels of Kir2.1, Cav1.2, or Cav3.1 α -subunit channels were unmodified by leptin. Protein expression levels of Kv4.2, Kv4.3 and KCHIP2 subunits were also increased by leptin. The electrophysiological study showed that leptin increases the fast transient outward potassium current amplitudes and densities shortening action potential duration. In addition, leptin activated Akt signaling in cardiomyocytes and this mechanism was involved in the effect of leptin on I_{tof} channels. In conclusion, leptin increases both the expression and function of I_{tof} channels in adult ventricular myocytes and this mechanism involves Akt signaling. Altogether these data suggest that leptin could exert beneficial or detrimental effects depending on the initial ventricular myocyte repolarizing reserve.

Keywords leptin · Kv4.2 · Kv4.3 · Akt signaling · cardiomyocytes · transient outward potassium current · ionic channel remodeling

Introduction

Leptin is an adipocyte-derived protein hormone encoded by the OB-gene that is involved in the central regulation of food intake and energy expenditure [17, 63]. Sources of leptin are

not restricted to adipose tissue, and it is well accepted that myocardial tissue can also produce leptin, exerting autocrine and paracrine effects [2, 52]. In addition to this, leptin receptors OB-Ra and OB-Rb are expressed in the heart supporting a direct effect of leptin on cardiac tissue [41]. Furthermore, obesity, even when uncomplicated by hypertension or diabetes, is frequently associated with hyperleptinemia [13], and high levels of leptin have been postulated as a risk factor for heart failure [55].

Ion channel remodeling associated with myocardial damage is a well-known event that can contribute to cardiac rhythm disturbances in the pathological heart [3, 34, 54]. Studies in animal models and in humans have revealed that the ventricular action potential (AP) prolongation observed in failing hearts increases the risk to suffer arrhythmias and was associated with functional downregulation of ventricular repolarizing K^+ currents [3, 23, 24]. Indeed, changes in the expression of L- and T-type calcium channels have also been related to ventricular hypertrophy and heart failure [28, 40].

The stimulation of leptin cardiac receptor is associated with janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling and also with the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphoinositide-3-kinase (PI3K) pathways which have been implicated in myocyte hypertrophy and cardioprotection [49, 62]. In addition, enhanced PI3K signaling has been associated with upregulation of K^+ currents and improvement of electrical remodeling in pathological hypertrophy and heart failure [58].

During the last years, increasing attention has been paid to understand the mechanisms involved in the effects of leptin on cardiac function and remodeling [2, 42, 52, 56]. However, it remains unknown whether prolonged leptin treatment can modulate ionic channel expression in cardiac tissue. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of prolonged leptin exposure on the functional expression of the main channels that participate in the repolarizing phase of the ventricular AP in adult ventricular myocytes [35]. We have analyzed the effect of leptin on the fast transient outward potassium channel (I_{tof}) encoded by Kv4.2 and Kv4.3 α -subunits, the inwardly rectifying potassium (Kir) channel encoded by Kir2.1 α -subunit, the L-type calcium channel (I_{CaL}) encoded by the α -subunit Cav2.1, and the T-type calcium channel (I_{CaT}) encoded by the α -subunit Cav3.1. We report here that treatment of rat ventricular myocytes with leptin for 48 h upregulates the transcript and the protein level of the molecular components of I_{tof} channels and increases the amplitude and density of I_{tof} . However, transcription levels of Kir2.1, Cav1.2, or Cav3.1 α -subunit channels were unmodified by leptin treatment. Furthermore, our results demonstrate that the effect of leptin on the expression and function of the I_{tof} channel was mediated by AKT signaling.

Methods

Isolation of adult ventricular cardiomyocytes and experimental design

All experimental procedures were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union (2010/63/EU), and this study conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institute of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996). Experiments were approved by the Bioethical Committee of the Complutense University of Madrid.

Rats were heparinized (4 IU/g, i.p.) and properly anesthetized (sodium pentobarbital, 50 mg/kg, i.p.) with analgesia (buprenorfin, 0.05 mg/kg, i.p.). Adequacy of anesthesia was determined by assessing loss of the pedal reflex. Ventricular myocytes were isolated as previously described [46]. Briefly, the ascending aorta was cannulated and the heart was perfused in a Langendorff system with collagenase (251 IU/mL, Worthington type II). Hearts were first perfused for 2–3 min at 36–37°C with a standard Ca^{2+} -free Tyrode solution which contained 0.2 mmol/L EGTA, and then for 3–4 min approximately with the same Tyrode solution containing 251 IU/mL of collagenase type II (Worthington Biochemical) and supplemented with 0.1 mmol/L $CaCl_2$. After perfusion, the hearts were removed from the Langendorff apparatus and the left ventricle, excluding the septum, was cut up, chopped into small pieces, and gently stirred for 2–5 min in a standard Tyrode solution containing 0.1 mmol/L of $CaCl_2$ to disperse the isolated left ventricular myocytes. The resulting cell suspensions were filtered through a 250 μ m nylon mesh and centrifuged for 3 min at 20 $\times g$. The pellet obtained was resuspended in the Tyrode solution containing 0.5 mmol/L $CaCl_2$. Finally, the cells were again centrifuged and resuspended in a Tyrode solution containing 1 mM $CaCl_2$. This procedure yielded quiescent rod-shaped myocytes that were viable for up to 2 days when incubated at 37 °C in Tyrode solution supplemented with 1 mM $CaCl_2$, 10 IU/L insulin, 1 mg/mL BSA, 100 IU/mL penicillin, and 0.1 μ g/mL streptomycin [8, 15]. For each experiment, we employed ventricular cardiomyocytes isolated from two rat hearts which were stimulated for 48 h at 37 °C with vehicle (water) or 100 ng/mL of leptin. In some experiments, myocytes were pretreated for 1 h with 1 μ M of the AKT inhibitor triciribine. Cells were divided into four groups: one of them was treated with vehicle (DMSO 0.01 %), another one was treated with leptin 100 ng/mL plus vehicle (DMSO 0.01 %), another group was treated with 1 μ M triciribine, and finally, another group was pretreated for 1 h with triciribine and then with 100 ng/mL leptin. The leptin concentrations were chosen based on reported values of plasmatic concentration in obese individuals [43, 50] and on previous experimental studies in isolated myocytes [1].

Solutions and drugs

The Ca^{2+} -free Tyrode solution for myocyte isolation contained (in mmol/L): 130 NaCl, 5.4 KCl, 0.4 NaH_2PO_4 , 0.5 MgCl_2 , 25 HEPES, 5 NaHCO_3 , and 22 glucose; pH adjusted to 7.4 with NaOH.

The storage solution for myocytes incubation contained (in mmol/L): 130 NaCl, 5.4 KCl, 0.4 NaH_2PO_4 , 0.5 MgCl_2 , 25 HEPES, 5 NaHCO_3 , 22 glucose, 1 CaCl_2 , 10 IU/L insulin, 1 mg/mL BSA, 100 IU/mL penicillin, and 0.1 μg /mL streptomycin; pH 7.4.

The solution for I_{tof} current recordings contained (in mmol/L): 135 NaCl, 10 glucose, 10 HEPES, 1 MgCl_2 , 1 CaCl_2 , 5.4 KCl, and 2 CoCl_2 ; pH 7.4. The intracellular recording pipette solution contained (in mmol/L): 125 potassium aspartate, 25 KCl, 10 EGTA, 5 HEPES, 1 MgCl_2 , 5 ATP, and 0.4 GTP; pH 7.2.

Action potentials were measured in a standard external solution containing (mM): 140 NaCl, 4 KCl, 1.1 MgCl_2 , 1.8 CaCl_2 , 10 glucose and 10 HEPES (pH adjusted to 7.4 with NaOH). The internal solution contained (mM): 125 KCl, 4 MgCl_2 , 5 EGTA, 10 HEPES, 10 glucose, 5 Na_2ATP , and 5 disodium creatine phosphate; pH adjusted to 7.2 with KOH.

Electrophysiological recordings

Whole-cell recordings were obtained at room temperature (22–24 °C) using an Axopatch-200B amplifier (Axon Instruments) interfaced to a Digidata 1322A (Axon Instruments). The recording pipettes were made from 1.5-mm-OD soft-glass capillary tubing by using a P97/PC, Sutter Instruments puller. Pipettes tip resistances ranging from 0.9 to 2 $\text{M}\Omega$. Series resistances (R_s) averaged $4.4 \pm 0.1 \text{ M}\Omega$ ($n=65$) and was compensated by 80 %. Voltage-clamp paradigms were controlled by pClamp 8 software (Axon Instruments).

In the rat, the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) is composed of fast (I_{tof}) and slow (I_{tos}) components. I_{to} was evoked by depolarizing pulses from a holding potential of -80 mV to voltage steps from -70 to $+60 \text{ mV}$ in 10-mV increments for 500 ms; a prestep to -40 mV for 25 ms was used to inactivate sodium current. The pulse interval was 0.1 Hz. I_{tof} was obtained by the subtraction of the currents obtained before and after 3 mM 4-AP application [8, 15].

Membrane capacitance (C_m) was elicited by applying $\pm 10 \text{ mV}$ voltage steps from a holding potential of -60 mV , and C_m was calculated according to the equation:

$$C_m = \tau_c I_0 / \Delta E_m [1 - I_\infty / (I_0)]$$

where τ_c is the time constant of the membrane capacitance, I_0 is the maximum capacitance current value, ΔE_m

is the amplitude of the voltage step, and I_∞ the amplitude of the steady-state current. C_m was significantly higher in leptin-treated cells. C_m averaged $101.6 \pm 5.2 \text{ pF}$ in control cells ($n=22$) and $122.0 \pm 5.0 \text{ pF}$ in cells treated with leptin ($n=23$); $P < 0.01$.

We carried out current-clamp experiments to analyze APs in eight control and eight ventricular myocytes treated with leptin 100 ng/mL for 48 h. APs were elicited at 10-s intervals by 1.5-fold excitation threshold current pulses of 2.5 ms in duration. After stabilization of the records, ten successive APs were recorded. The parameters of the APs for each cell corresponded to the mean of these ten APs. The AP duration (APD) was measured at 20 %, 50 %, and 90 % repolarization.

The voltage dependence of activation was estimated from the chord conductance according to:

$$G = I / (V_m - V_{\text{rev}})$$

$$d\infty(V_m) = G / G_{\text{max}}$$

where G is the chord conductance calculated at membrane potential V_m , I is the current magnitude, and V_{rev} is the apparent reversal potential of the current. $d\infty(V_m)$ is the steady-state activation parameter and G_{max} is the maximal value of G .

Assuming a Boltzmann distribution, normalized data points were fitted by a nonlinear curve-fitting program to the following equation:

$$d\infty(V_m) = 1 / \{1 + \exp[(V_{50} - V_m)/k]\}$$

where V_{50} is the potential at which the conductance is half-maximally activated, and k is the slope factor describing the steepness of the activating curve.

The voltage dependence of steady-state inactivation for I_{tof} was determined by applying a 2 s conditioning pulse from a holding potential of -80 mV to a potential between -60 and 0 mV followed by a 500 ms test pulse to $+40 \text{ mV}$.

Test current (I) obtained from the different prepulses potentials were normalized to the maximal elicited current (I/I_{max}). The voltage dependence of I_{tof} inactivation could be approximated by a Boltzmann distribution function:

$$I/I_{\text{max}} = \{1 + \exp[(V_{50} - V_c)/k]\}^{-1}$$

where V_c is the voltage of the conditioning pulse, V_{50} is the potential at which the current is half-maximally inactivated, and k is the slope factor.

RNA extraction and real-time RT-PCR

The messenger ribonucleic acid (mRNA) level of several K^+ and Ca^{2+} channel subunits was measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). RNA was extracted from the cardiomyocytes using TRIzol reagent (Invitrogen), followed by chloroform extraction and isopropanol precipitation. The quantity of RNA was determined spectrophotometrically (Nanodrop, Bio-Rad).

cDNA synthesis was carried out using 1 μ g of RNA and QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen), in accordance with the manufacturer's instructions.

Quantitative PCR was performed in 96-well plates in a 25 μ l final volume that contained 2 μ l of cDNA, 12.5 μ l of Premix Ex Taq (TAKARA), and 0.2 μ l of each forward and reverse primer and 0.35 μ l of Probe (TIB Molbiol), or 1 μ l of each forward primer, reverse primer and, Probe premix (Applied Biosystems). The amplification program was 95 °C for 30 s followed by 45 cycles of 95 °C for 5 s, 56 °C for 20 s, and 72 °C for 15 s for TIB Molbiol primers, or 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min for Applied Biosystems primers. Each cDNA was amplified in triplicate and a corresponding sample without reverse transcriptase (no-RT sample) was included as negative control.

Primers and Taqman probes for calcium channels were (TIB Molbiol):

Cav1.2 sense 5'-AGCAACTTCCCTCAGACGTTTG-3', Cav1.2 antisense 5'-GCTTCTCATGGGACGGTGAT-3', and

Cav1.2 probe 5'-6FAM-CAACAAGACAGGGAACAACCAAGCGG-BBQ-3'; Cav3.2 sense 5'-CTACGTCGCATGTAGACAGCAAG-3', Cav3.2 antisense 5'-TGGTGAACACGATGTTGCTTATCTC-3', and Cav3.2 probe 5'-6FAM-CATGGCAGCCATCCTCGTCAATACTC-BBQ-3'.

Simultaneously, 18 s ribosomal RNA was amplified in a single PCR reaction to normalize the mRNA data. For 18 s rRNA the following primers were used: 18 s rRNA sense 5'-CGCAAATTACCCACTCCCGACCC-3', 18 s rRNA antisense 5'-GGCTACCACATCCAAGGAAG-3', and 18 s rRNA probe 5'-Tex-CAATTACAGGGCCTCGAAAGA-BBQ-3'.

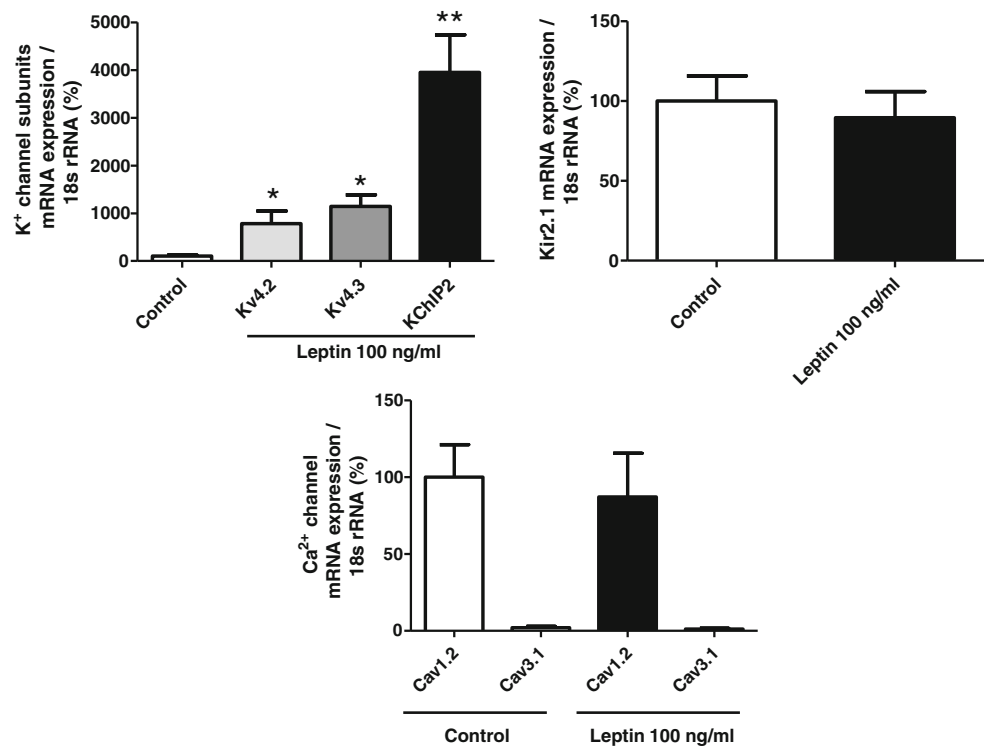
Primers and Taqman probes for potassium channels were provided by Applied Biosystems as preoptimized kits: Kv4.2 # Rn00581941, Kv4.3 # Rn00709608, KChIP2 # Rn04224181, Kir2.1 # Rn 00568808, and 18 s rRNA (as internal control) #4310893E.

The expression of the chosen genes was normalized to that of 18 s rRNA using the comparative CT method ($\Delta\Delta CT$) and expressed relative to control.

Western blot

Cardiomyocytes were homogenized in a buffer containing 320 mM sucrose and 50 mM Tris and IGEPAL 1 % as previously described [15, 45]. The buffer was supplemented with phosphatases and proteases inhibition cocktails (Sigma Aldrich). Then they were centrifuged at 13,000 $\times g$ for 15 min at 4 °C. The supernatants were used for immunoblotting.

Fig. 1 Expression levels of the transcripts encoding the K^+ and the Ca^{2+} α -channels subunits that underlie rat ventricular action potential repolarization. Channel subunits were measured in individual LV cardiomyocytes samples from control ($n=6$) and leptin-treated myocytes for 48 h ($n=6$). The mean \pm SEM relative expression levels of Kv4.2, Kv4.3, and KChIP2 channel subunit transcripts were significantly higher in leptin treated than in untreated ventricular myocytes. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. control



The extracted proteins were separated on SDS-PAGE gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were blocked with 5 % milk and incubated overnight with primary antibodies: Phospho-AKT (Thr308) and AKT (Cell Signaling), Kv4.2 (Millipore), Kv4.3 (Alomone Labs), the voltage-gated K⁺ channel-interacting proteins 2 (KChIP2; Affinity Bioreagents), and GAPDH (Ambion). After incubation with the primary antibodies, blots were incubated with peroxidase-linked secondary antibodies (1:15,000) for 60 min at room temperature. Immunoreactive bands were detected using the Amersham™ ECL™ protein detection system. The intensity of bands was measured with a CCD high-resolution detection system (Chemi Doc; Bio-Rad) coupled with a Bio-Rad personal computer analysis software (Quantity One) or with an Odyssey Fc. detection system (Li-cor).

Statistical analysis

Data are presented as mean±SEM. Statistical comparisons were made using unpaired Student's *t*-test or one-way

ANOVA followed by Bonferroni post-test for multiple comparison. *P*<0.05 was considered statistically significant.

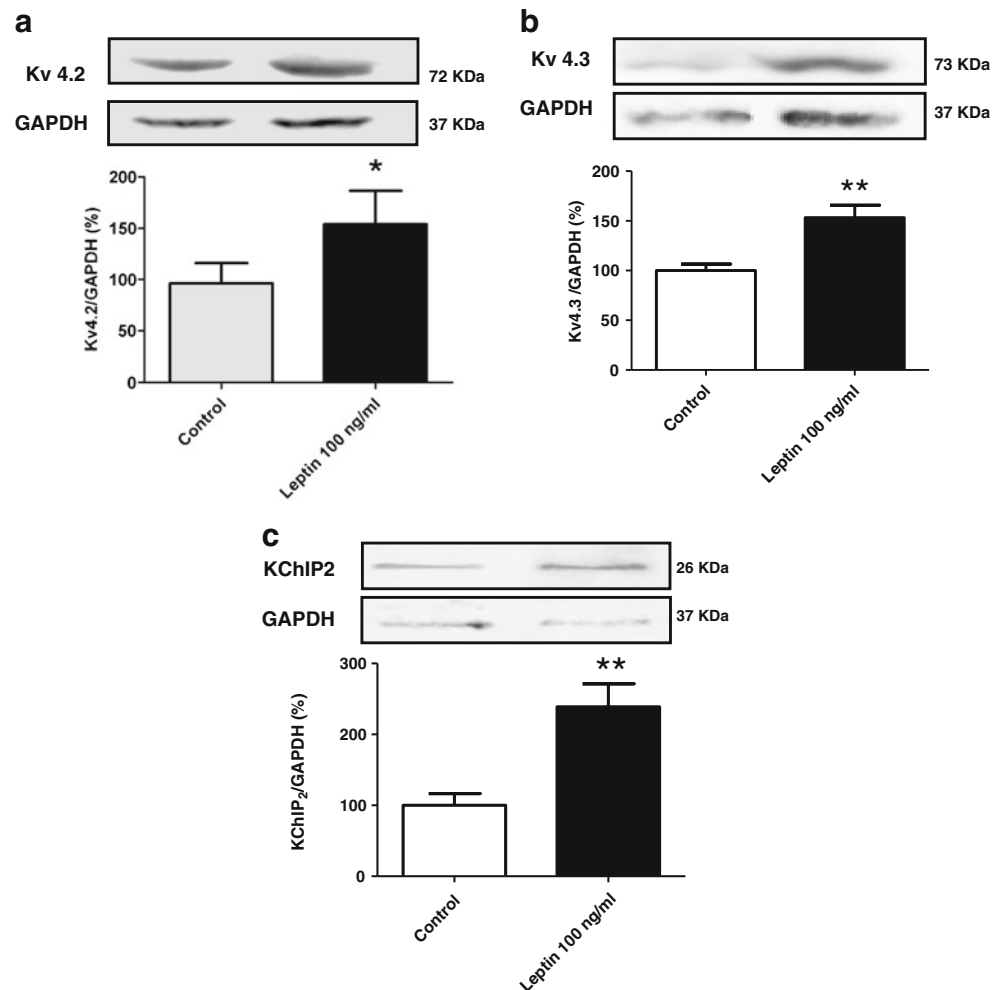
Results

Leptin induces transcriptional upregulation of Kv4.2, Kv4.3, and KChIP2 subunits but does not affect Kir2.1, Cav1.2, and Cav1.3 level expression

In the first group of experiments, we have investigated the effects of 48 h exposure of adult myocytes to 100 ng/mL leptin on the expression levels of transcripts encoding ion channel subunits involved in rat ventricular repolarization.

We find higher expression of the subunits encoding *I*_{to} channels, Kv4.2, Kv4.3, and Kv channel-interacting protein2 (KChIP2), an auxiliary protein that regulates the expression and/or the properties of ventricular *I*_{to} channels (Fig. 1A). In addition, we observed no significant changes in the mRNA levels of Kir2.1, inwardly rectifier potassium channels (Fig. 1B), Cav1.2,

Fig. 2 Leptin induces upregulation of Kv4.2, Kv4.3, and KChIP2 channels subunits. Leptin 100 ng/mL upregulated Kv4.2 (A), Kv4.3 (B), and KChIP2 (C) protein expression. Results are mean±SEM from six to eight independent experiments. * *P*<0.05, ** *P*<0.01 vs. control myocytes treated for 48 h with vehicle



L-type Ca^{2+} channels or Cav1.3, T-type Ca^{2+} channels (Fig. 1C).

Leptin induces upregulation of Kv4.2, Kv4.3, and KChIP2 protein expression

Since leptin upregulates mRNA levels of Kv4.2, Kv4.3 and KChIP2 channel subunits in ventricular myocytes, the next step was to examine the effect of leptin on the protein expression of these subunits. Figure 2A and B shows that 100 ng/mL leptin was also able to increase Kv4.2 and Kv4.3 protein expression in ventricular myocytes. In addition, Fig. 2C shows that KChIP2 was also increased by the long-term leptin cardiomyocyte treatment.

Leptin increases I_{tof} amplitudes and densities and reduces APD without modifying their activation or inactivation properties

The higher expression of Kv4.2/Kv4.3 and KChIP2 channel subunits obtained in cardiomyocytes treated with leptin suggests that the amplitude and densities of the fast transient outward current (I_{tof}) should be increased. Figure 3A shows representative recordings of I_{tof} from two isolated voltage-clamped cardiomyocytes. Depolarizing steps from -10 to $+60$ mV from a holding potential of -80 mV, evoked outward currents which were higher in the leptin-treated cardiomyocyte compared with the untreated cardiomyocyte. Figure 3B illustrates the current–voltage relations from control myocytes and

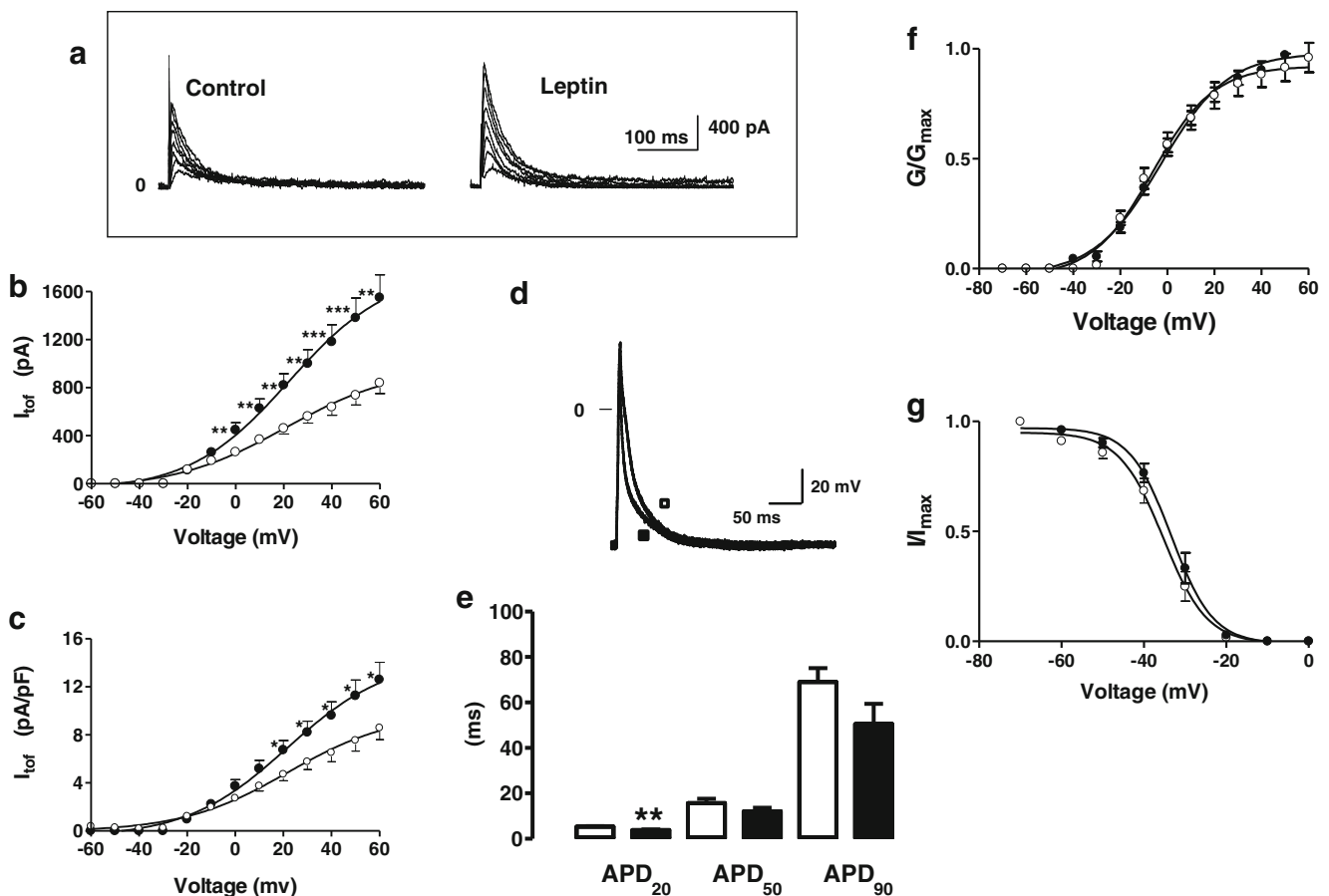


Fig. 3 Leptin increases fast transient outward potassium current amplitude and density in ventricular myocytes and reduces action potential (AP) duration (APD) without modifying the voltage dependence of I_{tof} activation and inactivation. **A** I_{tof} traces obtained from -10 mV to $+60$ mV in one control cardiomyocyte (left panel) and in one myocyte treated 48 h with leptin 100 ng/mL (right panel). **B–C** I – V relationships for I_{tof} amplitudes (**B**) or I_{tof} densities (**C**) measured in control myocytes treated for 48 h with vehicle (open circles; $n=22$) and in myocytes treated with leptin 100 ng/mL for 48 h (solid circles; $n=23$). Leptin induced an increase in I_{tof} amplitude and density. **D** Representative superimposed traces of APs recorded in one control myocyte (open square) and in one

myocyte treated 48 h with leptin (close square). **E** Mean APD values measured at 20 %, 50 %, and 90 % of repolarization (APD₂₀, APD₅₀, and APD₉₀, respectively) in eight control ventricular myocytes (open bars) and eight ventricular myocytes treated with leptin (filled bar). **F** Activation curves obtained in seven control ventricular myocytes (open circles) and in eight ventricular myocytes treated with leptin 100 ng/mL for 48 h (closed circles). **G** Inactivation curves obtained in six control ventricular myocytes (open circles) and in seven ventricular myocytes treated with leptin 100 ng/mL for 48 h (closed circles). Results are mean \pm SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs. control myocytes

myocytes treated with leptin. The voltage dependence was similar in both groups, but I_{tof} amplitude was significantly higher in cells treated with leptin from 0 to +60 mV. Figure 3C shows current density–voltage relations from control myocytes and myocytes treated with leptin. In this case, the amplitude of I_{tof} was normalized by the membrane capacitance to obtain the current density. The voltage dependence was similar in both groups, but I_{tof} density was significantly higher in cells treated with leptin from +20 to +60 mV which is consistent with the higher expression of Kv4.2/Kv4.3 and KChIP2 subunits obtained in cardiomyocytes treated with leptin. Figure 3D illustrates representative superimposed traces of APs recorded in one control (open square) and in one myocyte treated with leptin (closed square). The APD was shorter in the ventricular myocyte treated with leptin. Figure 3E shows mean APD values measured at 20 %, 50 %, and 90 % of repolarization (APD₂₀, APD₅₀, and APD₉₀, respectively) in control and leptin-treated myocytes. The treatment with leptin induced a significant reduction of APD₂₀ (5.3 ± 0.3 ms, $n=8$ in control and 3.8 ± 0.3 ms, $n=8$ in leptin-treated myocytes; $>P<0.01$).

Since the leptin-induced increase in I_{tof} could result from modification of channel properties, the voltage dependence of activation, and inactivation of I_{tof} were measured. Figure 3F shows the normalized conductance (G/G_{max}) vs. membrane potential in control myocytes and in myocytes treated with 100 ng/mL leptin. I_{tof} was

activated in both groups at voltages positives to −40 mV and fully activated at +60 mV. Both curves (treated and non-treated with leptin) showed similar values of half-maximal activation voltage (V_{50} , -35.3 ± 1.6 vs. -33.4 ± 1.7 mV in the leptin-treated group) and slope (k , -5.7 ± 0.7 vs. -5.0 ± 0.2 mV in the leptin-treated group, respectively). Figure 3G shows the voltage dependence of I_{tof} inactivation vs. membrane potential in control myocytes and in myocytes treated with 100 ng/mL leptin. The voltage dependence of I_{tof} inactivation in cells treated with leptin for 48 h was similar to that observed in control cells. The half-maximal inactivation voltage (V_{50} , -35.3 ± 1.6 vs. -33.4 ± 1.4 mV in the leptin-treated group) and the slope factor (k , -5.7 ± 0.7 vs. -5.0 ± 0.2 mV in the leptin-treated group) were also similar in both groups.

Leptin activates AKT pathway in ventricular myocytes

Previous reports have postulated that the activation of PI3K pathway is related to the upregulation of K^+ channels [57, 58]. Moreover, it has been reported that leptin is able to activate PI3K in the heart [49] and in neonatal rat cardiomyocytes [62]. To explore the implications of this mechanism in the leptin-induced upregulation of the molecular components of I_{tof} , we have investigated whether leptin activates AKT, a well-characterized target of PI3K [31, 48] in cardiomyocytes. When AKT phosphorylation was analyzed after leptin administration, a significant activation of AKT was

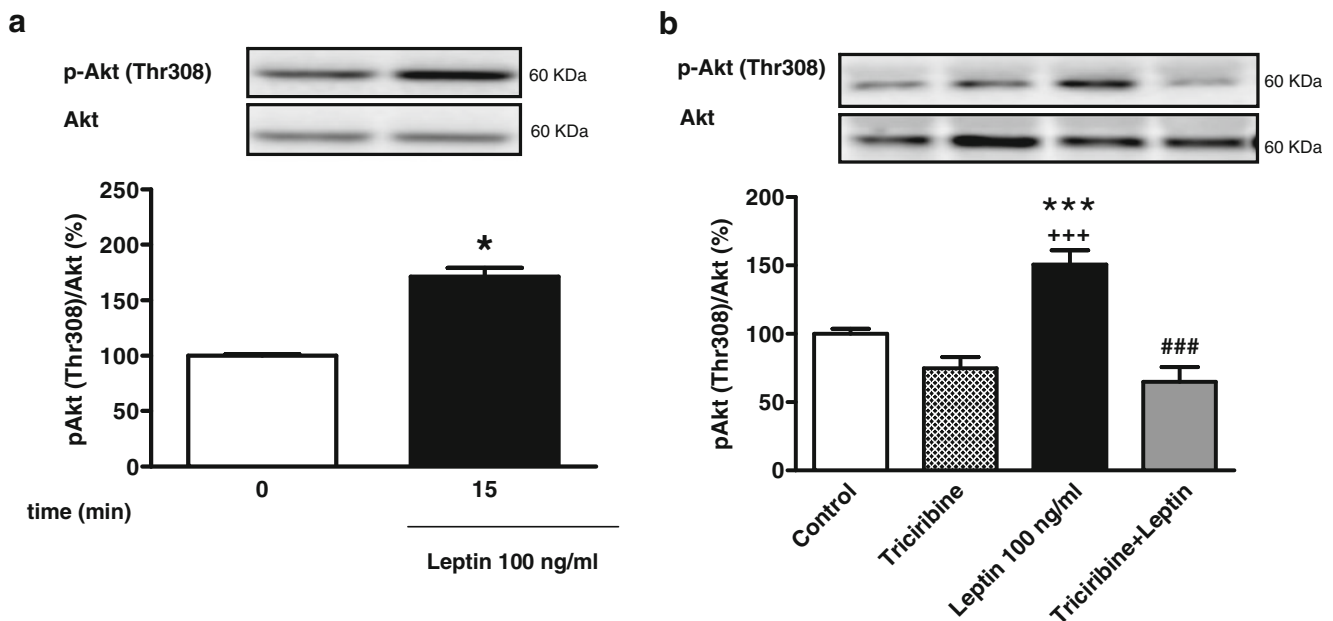


Fig. 4 Leptin activates AKT pathway in adult cardiomyocytes. **A** Ventricular myocytes were exposed to leptin 100 ng/mL for 15 min. A significant activation of AKT was observed after leptin treatment. **B** Pretreatment of myocytes with the AKT inhibitor triciribine (1 μ M)

completely abolished leptin-induced AKT activation. Results are mean \pm SEM from four independent experiments. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs. control, +++ $P<0.001$ vs. triciribine, and #### $P<0.001$ vs. leptin

observed at 15 min (Fig. 4A). Pretreatment of ventricular myocytes with the AKT inhibitor triciribine [9] completely abolished leptin-induced AKT activation (Fig. 4B).

Leptin induces upregulation of Kv4.2, Kv4.3, and KChIP2 protein expression through the AKT-pathway

After analyzing AKT activation following leptin treatment, we investigated whether the protein expression of the molecular components of I_{tof} was modulated by AKT.

Figure 5A shows that leptin induced a significant increase in Kv4.2 protein expression that was prevented by triciribine. Similar results were obtained for Kv4.3 (Fig. 5B) and KChIP2 (Fig. 5C). Altogether, these results demonstrate that leptin treatment upregulates protein expression of Kv4.2, Kv4.3, and KChIP2 through activation of AKT signaling.

Leptin increases I_{tof} amplitude and density through AKT signaling

To further confirm that AKT activation is involved in the functional modulation of Kv4.2/Kv4.3 by leptin, I_{tof} at +

40 mV was recorded in cardiomyocytes pretreated with triciribine and in cardiomyocytes pretreated with triciribine plus leptin. Figure 6A shows similar I_{tof} traces obtained at +40 mV in myocytes treated with triciribine (upper panel) and in myocytes pretreated with triciribine and leptin (bottom panel). The bar graphs in Fig. 6B and C show the mean values of I_{tof} amplitude and I_{tof} density at +40 mV, respectively, obtained in control cells ($n=22$), in cells treated with leptin ($n=23$), in cells only treated with triciribine ($n=7$), and in cells treated with triciribine plus leptin ($n=13$).

The presence of triciribine prevents the effects induced by leptin on I_{tof} in ventricular myocytes.

Discussion

The novel finding of this study is that prolonged leptin treatment upregulates I_{tof} channels through AKT signaling in adult ventricular myocytes. It is well known that the alteration of K^+ channels is a major cause of electrophysiological remodeling in the pathological heart. It

Fig. 5 Leptin induces upregulation of Kv4.2, Kv4.3 and KChIP2 protein expression through AKT-pathway. Treatment with leptin 100 ng/mL for 48 h was able to induce a significant increase of Kv4.2 (A), Kv4.3 (B) and KChIP2 (C) protein expression that was prevented by pretreatment with 1 μ M triciribine (A–C). Results are means \pm SEM from five independent experiments. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. control; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$ vs. triciribine and # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. leptin

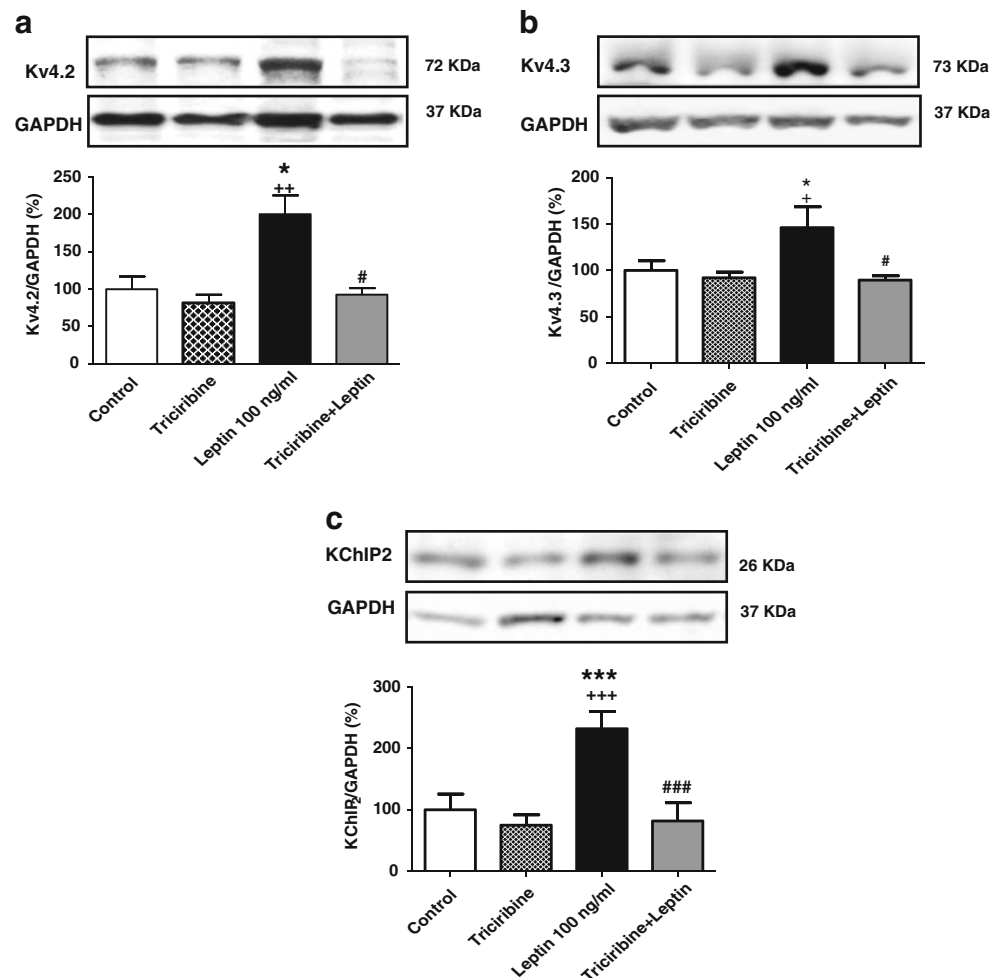
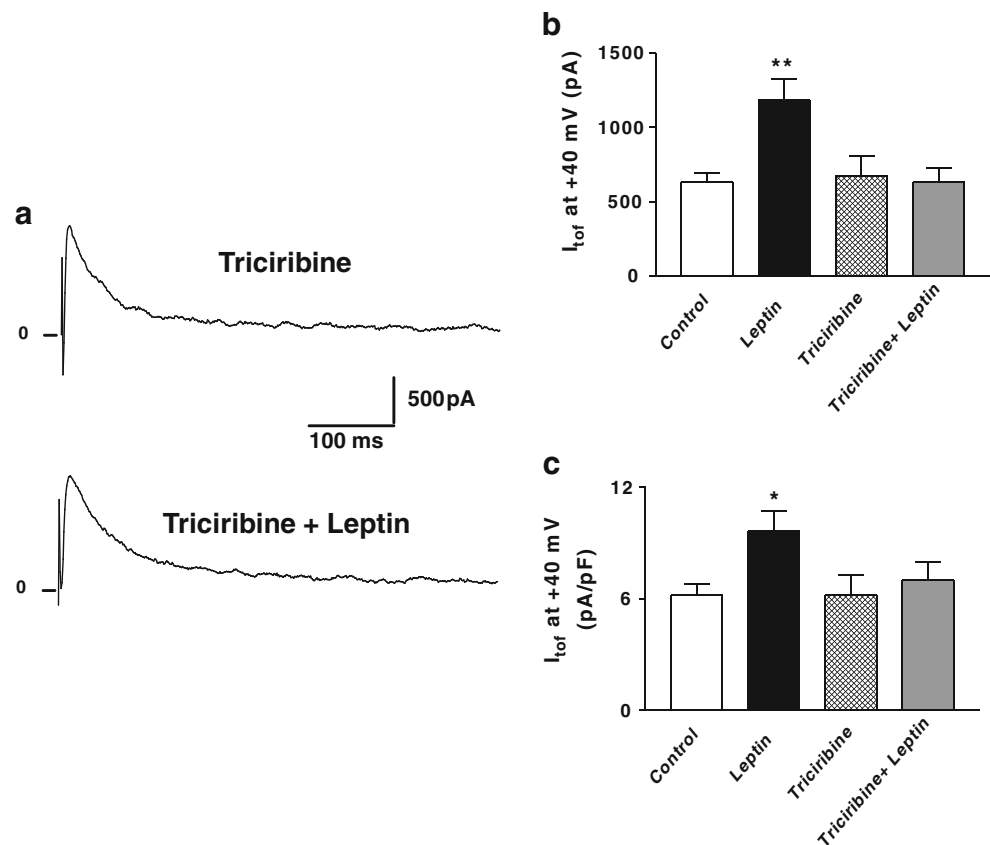


Fig. 6 AKT signaling inhibition prevented the increase in I_{tof} amplitude and density induced by leptin. **A** I_{tof} traces obtained at +40 mV in one cardiomyocyte treated with 1 μM triciribine and in one myocyte treated with triciribine plus leptin. **B** and **C** Bar graphs showing mean values of I_{tof} amplitude (**B**) or densities (**C**) obtained at +40 mV in control cells ($n=22$), in cells treated with leptin ($n=23$), in cells only treated with triciribine ($n=7$), and in cells treated with triciribine plus leptin ($n=13$). In the presence of 1 μM triciribine, leptin was unable to modify I_{tof} density and amplitude. Results are means \pm SEM



has been widely demonstrated that I_{tof} , which plays an important role in determining regional heterogeneity of cardiomyocyte repolarization as well as cardiomyocyte contractility [47], is downregulated in many models of left ventricular hypertrophy (LVH) and heart failure (HF) [7, 10, 18]. In addition to I_{tof} channel remodeling, downregulation of the inwardly rectifying K^+ current (I_{K1}), which plays an important role in the final repolarization phase and in maintaining the stability of the ventricular resting potential, has also been described in LVH and HF [10, 24]. Studies on L-type Ca^{2+} (I_{CaL}) current, the main source of Ca^{2+} entry in cardiac myocytes that contributes to the plateau phase of the AP and is critical for the excitation–contraction process in cardiac myocytes have produced varying results. Some studies in ventricular myocytes of failing hearts have shown a decrease [33, 37], and others no change [26, 32] in I_{CaL} currents densities. In addition, T-type Ca^{2+} channels that are present in neonatal ventricular cardiomyocytes and in pacemaker cells are not detected in adult ventricular myocytes. Nevertheless, T-type Ca^{2+} channels can be re-expressed under pathological conditions [21, 28].

The results of the present study show that mRNA levels and protein expression of Kv4.2/Kv4.3, the α -subunits largely responsible for the I_{tof} in the rat and

the auxiliary subunit KChIP2 which is determinant in controlling the cell surface expression of I_{tof} channel [43, 50] are upregulated in ventricular myocytes treated with leptin. However, leptin treatment was ineffective in modulating mRNA expression of other cardiac channel subunits involved in the repolarization phase of the ventricular AP including Kir2.1, Cav1.2, or Cav3.1. Our results show that leptin increases I_{tof} amplitudes and densities shortening APD, without modifying the activation or inactivation properties of I_{tof} channels, reflecting a good correlation between functional and molecular parameters. Several studies [57, 58], but not all [59], have postulated that AKT activation induced by exercise training can upregulate K^+ channels and improve the pathological electrical remodeling associated with LVH and dilated cardiomyopathy. In neurons, upregulation of Kv4.2 subunit by neurotrophic factors, such as neuregulin-1 or neuritin, were reported to be mediated by AKT signaling [60, 61]. In addition, it has been published that leptin is able to activate AKT signaling in cultured neonatal ventricular myocytes [49, 62]. In the present study, we have shown that leptin activates AKT pathway in adult ventricular myocytes, and pharmacological inhibition of this pathway prevented the leptin-induced upregulation of I_{tof} channels. It is well

known that when Akt is activated, it dissociates from the membrane and translocate to the cytosol and nucleus, where it activates downstream signaling pathways. These pathways can mediate Akt long-term effects in protein expression. Then, Akt signaling is terminated by dephosphorylation of Thr308 and Ser473 through the action of protein phosphatase 2 (PP2) and PH domain leucinerich repeat phosphatase (PHLPP) [4, 11]. This regulatory mechanism may explain why the activation of Akt after 15 min of leptin treatment can be enough to mediate long-term effects in our study. Moreover, AKT signaling is involved in the regulation of protein synthesis and cytoprotection of cardiac myocytes [30]. Studies in transgenic mice have confirmed that AKT activation is essential for both cell growth and physiological hypertrophy [29, 48]. Our study demonstrates that the upregulation of Kv4.2 and Kv4.3 α -subunits protein expression induced by leptin is paralleled by upregulation in mRNA expression. Substrates of AKT include glycogen synthase kinase (GSK3 β) and forkhead transcription factors (Foxo1 and Foxo3a) [53]. It has been reported that Foxo family regulates the promoter activity of several K⁺ channels [39]. GSK3 β also modulates the activity of several transcription factors including nuclear factors of activated T-cells (NFAT) promoting their nuclear export [16] which could contribute to the transcriptional regulation of K⁺ channels expression [19]. Further studies will be necessary to explore these hypotheses.

In rodents, I_{tof} has a major contribution to phase 1 of ventricular repolarization and APD. In humans, direct contribution of I_{tof} to ventricular APD is limited, although changes in I_{tof} amplitude can alter the amplitude of the plateau phase and thereby indirectly change the kinetics of other transmembrane currents, including I_{CaL} [6]. Therefore, changes in I_{tof} channel expression could modulate excitation–contraction coupling in myocardial cells [47]. We propose that the upregulation of I_{tof} channels induced by leptin could reduce APD, decreasing the duration of Ca²⁺ influx and attenuating cardiomyocyte contractility; however, the consequences of the effect of leptin on I_{tof} channels on cardiomyocytes from pathologic heart could be different. Plasma leptin levels (5–15 ng/mL in lean subjects) are significantly elevated in human obesity (15–500 ng/mL) [38, 43]. However, in obese individuals, leptin usually loses the ability to inhibit energy intake and increase energy expenditure, a phenomenon, referred to as leptin resistance [14]. Nevertheless, there is experimental evidence that leptin resistance would be tissue-dependent and cardiac tissue could be able to preserve full responsiveness to leptin [20, 51]. On the other hand, it is well known that obesity is often associated with pathologies such as diabetes and/or hypertension, providing a status of complicated obesity [5]. This status is characterized by adverse effects on the

heart that include pathological cardiac hypertrophy and downregulation of K⁺ currents [12, 25, 27]. In this scenario, the mechanism of leptin-induced upregulation of I_{tof} channels that we have shown in our experimental study might have a beneficial effect by compensating the reduced K⁺ repolarizing reserve that occurs in pathological hypertrophy associated with hypertension and/or diabetes. Therefore, leptin could protect the pathologic heart from an excessive prolongation of APD, reducing the increased risk of arrhythmias and sudden death in patients with complicated obesity. The possibility that leptin, through this mechanism, could participate in the more favorable clinical outcomes (obesity paradox) [22] seen in obese patients with congestive HF [36] or coronary heart disease [44], compared with normal weight patients, remains as an interesting question to be answered.

Acknowledgment The authors thank Manuel Bas for expert technical assistance.

Sources of funding This work was supported by MICINN (SAF2010-16377), RIC (Red de Investigación Cardiovascular; RD12/0042/0019), Mutua Madrileña (FMM2010), and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII; CP11/0080). N.G.H. is a predoctoral fellow of the Spanish Ministry of Education.

Conflict of interest None

References

1. Abe Y, Ono K, Kawamura T, Wada H, Kita T, Shimatsu A, Hasegawa K (2007) Leptin induces elongation of cardiac myocytes and causes eccentric left ventricular dilatation with compensation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H2387–H2396. doi:10.1152/ajpheart.00579.2006
2. Abel ED, Litwin SE, Sweeney G (2008) Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev* 88:389–419. doi:10.1152/physrev.00017.2007
3. Aiba T, Tomaselli GF (2010) Electrical remodeling in the failing heart. *Curr Opin Cardiol* 25:29–36. doi:10.1097/HCO.0b013e328333d3d6
4. Andjelković M, Jakubowicz T, Cron P, Ming XF, Han JW, Hemmings BA (1996) Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5699–5704
5. Ashrafian H, Athanasiou T, le Roux CW (2011) Heart remodelling and obesity: the complexities and variation of cardiac geometry. *Heart* 97:171–172. doi:10.1136/hrt.2010.207092
6. Bassani RA (2006) Transient outward potassium current and Ca²⁺ homeostasis in the heart: beyond the action potential. *Braz J Med Biol Res* 39:393–403
7. Bénitah JP, Gomez AM, Bailly P, Da Ponte JP, Berson G, Delgado C, Lorente P (1993) Heterogeneity of the early outward current in ventricular cells isolated from normal and hypertrophied rat hearts. *J Physiol* 469:111–138
8. Bénitah JP, Perrier E, Gómez AM, Vassort G (2001) Effects of aldosterone on transient outward K⁺ current density in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 537:151–160

9. Berndt N, Yang H, Trinczek B, Betzi S, Zhang Z, Wu B, Lawrence NJ, Pellicchia M, Schönbrunn E, Cheng JQ, Sefti SM (2010) The Akt activation inhibitor TCN-P inhibits Akt phosphorylation by binding to the PH domain of Akt and blocking its recruitment to the plasma membrane. *Cell Death Differ* 17:1795–1804. doi:10.1038/cdd.2010.63
10. Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E (1993) Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 73:379–385
11. Brognard J, Sieracki E, Gao T, Newton AC (2007) PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell* 25:917–931. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.017
12. Casis O, Gallego M, Iriarte M, Sánchez-Chapula JA (2000) Effects of diabetic cardiomyopathy on regional electrophysiologic characteristics of rat ventricle. *Diabetologia* 43:101–109. doi:10.1007/s001250050013
13. de Simone G, Devereux RB, Roman MJ, Alderman MH, Laragh JH (1994) Relation of obesity and gender to left ventricular hypertrophy in normotensive and hypertensive adults. *Hypertension* 23: 600–606
14. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Cowley MA (2006) Leptin resistance and obesity. *Obesity (Silver Spring)* 14(Suppl 5):254S–258S. doi:10.1038/oby.2006.319
15. Fernandez-Velasco M, Ruiz-Hurtado G, Hurtado O, Moro MA, Delgado C (2007) TNF- α downregulates transient outward potassium current in rat ventricular myocytes through iNOS overexpression and oxidant species generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H238–H245. doi:10.1152/ajpheart.01122.2006
16. Frame S, Cohen P (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359:1–16
17. Friedman JM, Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763–770. doi:10.1038/27376
18. Gómez AM, Benitah JP, Henzel D, Vinet A, Lorente P, Delgado C (1997) Modulation of electrical heterogeneity by compensated hypertrophy in rat left ventricle. *Am J Physiol* 272:H1078–H1086
19. Gong N, Bodi I, Zobel C, Schwartz A, Molkentin JD, Backx PH (2006) Calcineurin increases cardiac transient outward K⁺ currents via transcriptional up-regulation of Kv4.2 channel subunits. *J Biol Chem* 281:38498–38506. doi:10.1074/jbc.M607774200
20. Guzmán-Ruiz R, Somoza B, Gil-Ortega M, Merino B, Cano V, Attané C, Castan-Laurell I, Valet P, Fernández-Alfonso MS, Ruiz-Gayo M (2010) Sensitivity of cardiac carnitine palmitoyltransferase to malonyl-CoA is regulated by leptin: similarities with a model of endogenous hyperleptinemia. *Endocrinology* 151:1010–1018. doi:10.1210/en.2009-1170
21. Huang B, Qin D, Deng L, Boutjdir M, El-Sherif N (2000) Reexpression of T-type Ca²⁺ channel gene and current in post-infarction remodeled rat left ventricle. *Cardiovasc Res* 46:442–449
22. Hughes V (2013) The big fat truth. *Nature* 497:428–430. doi:10.1038/497428a
23. Kääb S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF (1998) Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 98:1383–1393
24. Kääb S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, Marban E, Tomaselli GF (1996) Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 78:262–273
25. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS (2002) Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 347:305–313. doi:10.1056/NEJMoa020245
26. Li GR, Lau CP, Ducharme A, Tardif JC, Nattel S (2002) Transmural action potential and ionic current remodeling in ventricles of failing canine hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1031–H1041. doi:10.1152/ajpheart.00105.2002
27. Li X, Xu Z, Li S, Rozanski GJ (2005) Redox regulation of I_{to} remodeling in diabetic rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1417–H1424. doi:10.1152/ajpheart.00559.2004
28. Martínez ML, Heredia MP, Delgado C (1999) Expression of T-type Ca(2+) channels in ventricular cells from hypertrophied rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 31:1617–1625. doi:10.1006/jmcc.1999.0998
29. Matsui T, Li L, Wu JC, Cook SA, Nagoshi T, Picard MH, Liao R, Rosenzweig A (2002) Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J Biol Chem* 277: 22896–22901. doi:10.1074/jbc.M200347200
30. Matsui T, Rosenzweig A (2005) Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol* 38:63–71. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.11.005
31. McMullen JR, Amirahmadi F, Woodcock EA, Schinke-Braun M, Bouwman RD, Hewitt KA, Mollica JP, Zhang L, Zhang Y, Shioi T, Buerger A, Izumo S, Jay PY, Jennings GL (2007) Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110 α) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:612–617. doi:10.1073/pnas.0606663104
32. Mewes T, Ravens U (1994) L-type calcium currents of human myocytes from ventricle of non-failing and failing hearts and from atrium. *J Mol Cell Cardiol* 26:1307–1320. doi:10.1006/jmcc.1994.1149
33. Mukherjee R, Hewett KW, Walker JD, Basler CG, Spinale FG (1998) Changes in L-type calcium channel abundance and function during the transition to pacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 37:432–444
34. Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH (2007) Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* 87:425–456. doi:10.1152/physrev.00014.2006
35. Nerbonne JM, Kass RS (2005) Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 85:1205–1253. doi:10.1152/physrev.00002.2005
36. Oreopoulos A, Padwal R, Kalantar-Zadeh K, Fonarow GC, Norris CM, McAlister FA (2008) Body mass index and mortality in heart failure: a meta-analysis. *Am Heart J* 156:13–22. doi:10.1016/j.ahj.2008.02.014
37. Ouadid H, Albat B, Nargeot J (1995) Calcium currents in diseased human cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 25:282–291
38. Pereg L, Pizzocri P, Corradi D, Maisano F, Paganelli M, Fiorina P, Barbieri M, Morabito A, Paolisso G, Folli F, Pontiroli AE (2005) Circulating leptin correlates with left ventricular mass in morbid (grade III) obesity before and after weight loss induced by bariatric surgery: a potential role for leptin in mediating human left ventricular hypertrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4087–4093. doi:10.1210/jc.2004-1963
39. Philip-Couderc P, Tavares NI, Roatti A, Lerch R, Montessuit C, Baertschi AJ (2008) Forkhead transcription factors coordinate expression of myocardial KATP channel subunits and energy metabolism. *Circ Res* 102:e20–e35. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.166744
40. Pitt GS, Dun W, Boyden PA (2006) Remodeled cardiac calcium channels. *J Mol Cell Cardiol* 41:373–388. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.06.071
41. Purdham DM, Zou MX, Rajapurohitam V, Karmazyn M (2004) Rat heart is a site of leptin production and action. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H2877–H2884. doi:10.1152/ajpheart.00499.2004
42. Ren J (2004) Leptin and hyperleptinemia—from friend to foe for cardiovascular function. *J Endocrinol* 181:1–10
43. Rider OJ, Petersen SE, Francis JM, Ali MK, Hudsmith LE, Robinson MR, Clarke K, Neubauer S (2011) Ventricular hypertrophy and cavity

- dilatation in relation to body mass index in women with uncomplicated obesity. *Heart* 97:203–208. doi:[10.1136/hrt.2009.185009](https://doi.org/10.1136/hrt.2009.185009)
44. Romero-Corral A, Montori VM, Somers VK, Korinek J, Thomas RJ, Allison TG, Mookadam F, Lopez-Jimenez F (2006) Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies. *Lancet* 368:666–678. doi:[10.1016/S0140-6736\(06\)69251-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69251-9)
 45. Ruiz-Hurtado G, Gomez-Hurtado N, Fernandez-Velasco M, Calderon E, Smani T, Ordonez A, Cachafeiro V, Bosca L, Diez J, Gomez AM, Delgado C (2012) Cardiotrophin-1 induces sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and arrhythmogenesis in adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 96:81–89. doi:[10.1093/cvr/cvs234](https://doi.org/10.1093/cvr/cvs234)
 46. Ruiz-Hurtado G, Gómez-Hurtado N, Fernández-Velasco M, Calderón E, Smani T, Ordoñez A, Cachafeiro V, Bosca L, Diez J, Gómez AM, Delgado C (2012) Cardiotrophin-1 induces sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and arrhythmogenesis in adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 96:81–89. doi:[10.1093/cvr/cvs234](https://doi.org/10.1093/cvr/cvs234)
 47. Sah R, Ramirez RJ, Oudit GY, Gidrewicz D, Trivieri MG, Zobel C, Backx PH (2003) Regulation of cardiac excitation–contraction coupling by action potential repolarization: role of the transient outward potassium current (I_{to}). *J Physiol* 546:5–18
 48. Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM, Lawitts J, Cantley LC, Izumo S (2000) The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J* 19:2537–2548. doi:[10.1093/emboj/19.11.2537](https://doi.org/10.1093/emboj/19.11.2537)
 49. Smith CC, Mocanu MM, Davidson SM, Wynne AM, Simpkin JC, Yellon DM (2006) Leptin, the obesity-associated hormone, exhibits direct cardioprotective effects. *Br J Pharmacol* 149:5–13. doi:[10.1038/sj.bjp.0706834](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706834)
 50. Soliman AT, Omar M, Assem HM, Nasr IS, Rizk MM, El Matary W, El Alaily RK (2002) Serum leptin concentrations in children with type 1 diabetes mellitus: relationship to body mass index, insulin dose, and glycemic control. *Metabolism* 51:292–296
 51. Stucchi P, Guzmán-Ruiz R, Gil-Ortega M, Merino B, Somoza B, Cano V, de Castro J, Sevillano J, Ramos MP, Fernández-Alfonso MS, Ruiz-Gayo M (2011) Leptin resistance develops spontaneously in mice during adult life in a tissue-specific manner. Consequences for hepatic steatosis. *Biochimie* 93:1779–1785. doi:[10.1016/j.biochi.2011.06.020](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.020)
 52. Sweeney G (2010) Cardiovascular effects of leptin. *Nat Rev Cardiol* 7:22–29. doi:[10.1038/nrcardio.2009.224](https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.224)
 53. Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP (2004) The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 380:297–309. doi:[10.1042/BJ20040167](https://doi.org/10.1042/BJ20040167)
 54. Wang Y, Hill JA (2010) Electrophysiological remodeling in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 48:619–632. doi:[10.1016/j.yjmcc.2010.01.009](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.01.009)
 55. Wannamethee SG, Shaper AG, Whincup PH, Lennon L, Sattar N (2011) Obesity and risk of incident heart failure in older men with and without pre-existing coronary heart disease: does leptin have a role? *J Am Coll Cardiol* 58:1870–1877. doi:[10.1016/j.jacc.2011.06.057](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.06.057)
 56. Yang R, Barouch LA (2007) Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ Res* 101:545–559. doi:[10.1161/CIRCRESAHA.107.156596](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.156596)
 57. Yang KC, Foeger NC, Marionneau C, Jay PY, McMullen JR, Nerbonne JM (2010) Homeostatic regulation of electrical excitability in physiological cardiac hypertrophy. *J Physiol* 588:5015–5032. doi:[10.1113/jphysiol.2010.197418](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.197418)
 58. Yang KC, Jay PY, McMullen JR, Nerbonne JM (2012) Enhanced cardiac PI3K α signalling mitigates arrhythmogenic electrical remodelling in pathological hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 93:252–262. doi:[10.1093/cvr/cvr283](https://doi.org/10.1093/cvr/cvr283)
 59. Yang KC, Tseng YT, Nerbonne JM (2012) Exercise training and PI3K α -induced electrical remodeling is independent of cellular hypertrophy and Akt signaling. *J Mol Cell Cardiol* 53:532–541. doi:[10.1016/j.yjmcc.2012.07.004](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.07.004)
 60. Yao JJ, Gao XF, Chow CW, Zhan XQ, Hu CL, Mei YA (2012) Neurexin activates insulin receptor pathway to up-regulate Kv4.2-mediated transient outward K⁺ current in rat cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* 287:41534–41545. doi:[10.1074/jbc.M112.390260](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.390260)
 61. Yao JJ, Sun J, Zhao QR, Wang CY, Mei YA (2013) Neuregulin-1 / ErbB4 signaling regulates Kv4.2-mediated transient outward K⁺ current through the Akt/mTOR pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 304(12):H1651–H1661. doi:[10.1152/ajpcell.00041.2013](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00041.2013)
 62. Zeidan A, Hunter JC, Javadov S, Karmazyn M (2011) mTOR mediates RhoA-dependent leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 352:99–108. doi:[10.1007/s11010-011-0744-2](https://doi.org/10.1007/s11010-011-0744-2)
 63. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425–432. doi:[10.1038/372425a0](https://doi.org/10.1038/372425a0)